

Institut für Molekulare Mechanismen bei Krankheiten
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet et phil. II Michael O. Hottinger
Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Remodeling des hyalinen Knorpels nach Setzen eines subchondralen
Knochendefektes in der proximalen Metaphyse der Tibia: eine
experimentelle Studie in Schafen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Joya Marina Kaserer

Tierärztin
aus Bludenz, Österreich

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. med. vet. Hans Geyer, Korreferent

2019

Für meine Familie,
die mich immer bedingungslos unterstützt
und an mich glaubt.

Danke.



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung
Summary.....
1 Einleitung.....	3
1.1 Problemstellung.....	3
1.2 Ziel der Studie.....	3
2 Literaturübersicht	5
2.1 Das Schaf als Versuchstier	5
2.2 Knorpel	5
2.3 Zone des kalzifizierten Knorpels	6
2.4 Subchondrale Knochenplatte und Subchondraler Knochen	6
2.5 Osteoarthritis (OA)	7
2.6 Rolle von subchondralem Knochen und kalzifizierter Zone in der Knorpelregeneration.....	8
2.6.1 Möglichkeiten zum Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten	9
2.6.2 Hinweise für Osteoblasten-Chondrozyten-Kommunikation.....	10
2.6.3 Knorpel-Knochen-Kommunikation in der Knorpelregeneration...	11
2.7 Chondroprotektive Therapieansätze bei OA	12
2.7.1 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs).....	12
2.7.2 Transdermale Applikation	12
2.7.3 Parathormon (PTH)	14
2.8 Evaluierung des Knorpels.....	15
2.8.1 Makroskopische Evaluierung	15
2.8.2 Mikroskopische Evaluierung	15
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Versuchstiere.....	16

3.2	Aufbau der Studie	18
3.3	Operation.....	18
3.3.1	Operationsvorbereitung.....	18
3.3.2	Anästhesie	19
3.4	Chirurgischer Eingriff.....	20
3.5	Postoperatives Management	22
3.5.1	Diclofenac- und Valeophyt-Gruppe.....	22
3.5.2	Kontrollgruppe.....	23
3.5.3	PTH-Gruppe	23
3.5.4	Fluoreszenz-Marker.....	23
3.5.5	Synovialflüssigkeit.....	24
3.6	Probenaufarbeitung und –auswertung.....	24
3.6.1	Gewinnung und Aufarbeitung der Proben.....	24
3.6.2	Histologie	24
3.7	Evaluationsmethoden.....	25
3.7.1	Makroskopische Auswertung.....	25
3.7.2	Histomorphometrische Auswertung.....	25
3.7.3	Histologische Auswertung.....	27
3.7.4	Auswertung der Fluoreszenz-Schnitte	29
3.7.5	Statistik	30
4	Resultate	31
4.1	Operation und postoperative Phase.....	31
4.2	Schlachtung und makroskopische Auswertung.....	31
4.3	Makroskopische Beurteilung des Knorpels.....	32
4.3.1	Deskriptive Bewertung des Knorpels.....	32
4.3.2	Auswertung nach Outerbridge.....	32
4.4	Histomorphometrische Beurteilung.....	34
4.4.1	Fläche der kalzifizierten Zone des Knorpels.....	34

4.4.2	Durchmesser der kalzifizierten Zone.....	35
4.4.3	Durchmesser des Knorpels.....	36
4.4.4	Distanz von der Knorpeloberfläche bis zum proximalen Defektrand	37
4.4.5	Distanz von der Tidemark bis zum proximalen Defektrand	38
4.5	Qualitative Auswertung des subchondralen Knochens mittels Fluoreszenz	38
4.5.1	Calcein grün.....	38
4.5.2	Xylenol orange.....	39
4.5.3	Oxytetracyclin.....	39
4.6	Histologische Auswertung	39
4.6.1	Histologische Auswertung nach Mankin.....	39
4.6.2	Histologische Auswertung van Kossa/McNeal.....	42
4.6.3	Statistisch signifikante Korrelationen	44
5	Diskussion	46
5.1	Ziel der Studie.....	46
5.2	Das Schaf als Versuchstier	46
5.3	Operation und postoperative Phase	46
5.3.1	Operationsmethode	46
5.3.2	Operation	46
5.3.3	Postoperative Phase.....	47
5.4	Probengewinnung und –aufarbeitung.....	47
5.5	Makroskopische Auswertung	48
5.5.1	Makroskopische Auswertung nach Outerbridge.....	49
5.6	Histomorphometrische Auswertung	49
5.7	Histologische Auswertung	52
5.7.1	Auswertung nach Mankin und Bewertung der histologischen Befunde.....	52

5.7.2	Rolle des subchondralen Knochens in der Knorpelregeneration ...	55
6	Literaturverzeichnis	57
7	Abkürzungsverzeichnis	65
8	Tabellenverzeichnis	66
9	Abbildungsverzeichnis.....	67
10	Anhang.....	69
10.1	Tabellen.....	69
10.2	Abbildungen.....	70
	Danksagung	
	Curriculum Vitae	

Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der Einfluss von chondroprotektiven Substanzen auf die Knorpelregeneration an Schafen untersucht. Nach Setzen eines standardisierten subchondralen Knochendefekts im Bereich der proximalen Metaphyse der Tibia erhielten die Versuchstiere über einen Zeitraum von 12 Wochen unterschiedliche Behandlungen.

Zwei Gruppen wurden transkutan mit einem speziell entwickelten Applikationssystem (Vetdrop[®]) behandelt. Eine Formulierung enthielt den Wirkstoff Diclofenac (DicloHyal[®]), die andere war rein pflanzlicher Natur (ProValeo2[®]). Bei einer Gruppe wurde der Einfluss von PTH₁₋₃₄ untersucht – sowohl im Defektbereich selbst als auch durch intraartikuläre Injektionen postoperativ. Die vierte Gruppe blieb unbehandelt. Nach 12 Wochen wurden die Versuchstiere geschlachtet und Proben zur Untersuchung entnommen.

Sowohl in der nachfolgenden makroskopischen als auch mikroskopischen Beurteilung des Knorpels zeigten Tiere aus der Diclofenac- und PTH-Gruppe im Durchschnitt eine geringere Knorpelschädigung als jene aus der Kontroll- und Valeophyt-Gruppe. Die chondroprotektive Eigenschaft der verwendeten Agenzien – insbesondere von Diclofenac und PTH₁₋₃₄ - kann durch diese Arbeit durchaus angenommen werden, wenngleich sie nicht statistisch bestätigt werden kann.

In der Zone des kalzifizierten Knorpels konnten außerdem Zellen mit „kalzifizierte Zellkappen“ beobachtet werden, deren Einfluss auf den Knorpel aber nicht geklärt werden konnte.

Summary

In this study the influence of chondroprotective substances on cartilage regeneration in sheep was investigated. After setting a standardized subchondral bone defect in the area of the proximal metaphysis of the tibia, the animals received different treatments over a period of 12 weeks.

Two groups were transcutaneously treated with a specially developed application system (Vetdrop®). One formulation contained the active ingredient diclofenac (DicloHyal®), the other was purely vegetable (ProValeo2®). In one group, the influence of PTH1-34 was investigated - both in the defect area itself and by intra-articular injections postoperatively. The fourth group was left untreated. After 12 weeks, the animals were slaughtered and samples were taken for examination.

In both the subsequent macroscopic and microscopic assessment of cartilage, animals from the diclofenac and PTH groups averaged less cartilage damage than those from the control and valeophyte groups. The chondroprotective properties of the agents used, in particular diclofenac and PTH1-34, can certainly be accepted by this work, although it can not be statistically confirmed.

In the area of calcified cartilage cells with "calcified cell caps" could also be observed, but their influence on the cartilage could not be clarified.

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Osteoarthritis (OA), verursacht durch Gelenktraumata oder degenerative Prozesse, stellt ein weit verbreitetes Problem vor allem der älteren Bevölkerung dar. Laut einer Veröffentlichung der „World Health Organization“ von 2015, ist davon auszugehen, dass sich die Bevölkerung der über 60-Jährigen zwischen 2015 und 2050 nahezu verdoppeln wird¹. Somit wird OA auch auf zukünftige Sicht gesehen ein Faktor bleiben, den es adäquat zu behandeln gilt. Verschiedene Methoden zur Knorpelreparation wurden in diversen Studien untersucht. Defektfüllende Konzepte^{2, 3}, aber auch Knochenmark-stimulierende Techniken sind beschrieben⁴⁻⁷. Knorpelerhaltende Eigenschaften konnten in einer aktuelleren Studie durch die Behandlung mit Carprofen durch ein transdermales Applikationssystem (Vetdrop®) nachgewiesen werden⁸. Die Bedeutung der Verbindung zwischen subchondralem Knochen und Knorpel und damit der Funktion der kalzifizierten Knorpelzone in der Knorpelheilung ist noch nicht geklärt und auch Studien zu diesem Thema sind spärlich vorhanden⁹⁻¹³. Der subchondrale Knochen und die kalzifizierte Zone des Knorpels werden als Faktoren in der Ernährung und Reparatursprozessen des darüber liegenden Gelenkknorpels von diversen Autoren vermutet¹⁴⁻¹⁷, jedoch direkte Nachweise der Verbindung und der Rolle des subchondralen Knochens im physiologischen Remodelierungs – oder Heilungsprozesses fehlen noch immer.

1.2 Ziel der Studie

Durch das Setzen eines subchondralen Defekts in einem definierten Abstand zur Knorpeloberfläche im Bereich des proximalen medialen Tibiaschafts wurde bei Schafen eine Schädigung des darüber liegenden Gelenkknorpels induziert, welche als Standardmodell vergleichbar mit den Folgen einer proximalen Trümmerfraktur der Tibia zu OA des direkt darüber liegenden Knorpels des Tibiaplateau führt. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss von nachweislich chondroprotektiven Substanzen auf die Knorpelregeneration nach einem Zeitraum von 12 Wochen zu untersuchen. Weiters war von Interesse, welche Rolle die kalzifizierte Zone des Knorpels und der darunter liegende subchondrale Knochen in diesen

Regenerationsprozessen einnehmen. Zu diesem Zweck wurden makroskopische, radiologische, histomorphometrische und histologische Evaluationsmethoden angewandt, um Veränderungen des Knorpels bestmöglich beurteilen zu können.

Hypothese dieser Studie war, dass Tiere, die mit chondroprotektiven Agentien behandelt werden im Vergleich zu Tieren, die keiner solchen Behandlung unterzogen werden, eine aktivere Knochenheilung im subchondralen Knochen und in der Folge eine bessere Knorpelbeschaffenheit aufweisen – sowohl makroskopisch, als auch histologisch – im Vergleich zu nicht behandelten Kontroll-Schafen. Ebenfalls wurde erwartet, dass eine höhere Zell- und Remodelierungsaktivität in der kalzifizierten Knorpelzone vorhanden sein würde.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Schaf als Versuchstier

Das Schaf als Versuchstier stellt ein ideales Model dar, um orthopädische Fragestellungen wie Knochen- und Knorpelheilung zu untersuchen, da die anatomischen Unterschiede im Aufbau des subchondralen Knochen und der verschiedenen Knorpelzonen zum Menschen relativ gering sind¹⁸ und Schafe eine Knochenstruktur mit vergleichbarer Belastbarkeit wie der Mensch besitzen^{19, 20}. Auch ist von Schafen bekannt, dass sie fast immer nach Eingriffen die operierte Gliedmaße gleich wieder benutzen, was sie ebenfalls für solche Projekte sehr attraktiv macht²⁰. Außerdem sind Schafe durch ihr gutmütiges Wesen weitgehend unkompliziert im Umgang und können während eines Versuches in einem annähernd ihrer Natur entsprechendem Umfeld gehalten werden. Somit ist das Schaf auch aus ethischen Aspekten als Versuchstier vertretbar.

2.2 Knorpel

Der hyaline Gelenkknorpel zählt zu den Stützgeweben des Körpers. Seine Hauptfunktion besteht darin, als reibungsarme und widerstandsfähige Oberfläche, Lasten aufzunehmen, zu verteilen und Bewegung in diarthrotischen Gelenken zu ermöglichen^{21, 22}. Der hyaline Gelenkknorpel ist gekennzeichnet durch das Fehlen von Blutgefäßen, Lymphgefäßen und Nerven, außerdem ist er zellarm²³. Gesunder Gelenkknorpel besteht aus einer dichten, hydratisierten extrazellulären Matrix, die von spezialisierten Zellen – nämlich den Chondrozyten – synthetisiert und aufrechterhalten wird²². Diese Matrix enthält kollagene Fasern, hauptsächlich von Typ II, Proteoglykane, nicht-kollagene Proteine²⁴ und als Hauptbestandteil rund 80% Wasser²⁵. Der Gelenkknorpel kann in verschiedene Schichten eingeteilt werden. Mit zunehmendem Abstand von der Knorpeloberfläche verändern sich Zellform und Zellgröße, Durchmesser der Kollagenfibrillen und deren Ausrichtung bezogen auf die Oberfläche, und außerdem Wasser- und Proteoglykangehalt der Matrix²³. In der dünnsten, oberflächlichen Schicht – der Tangentialzone – sind die Zellen parallel zur Knorpeloberfläche angeordnet und haben ein längliches, abgeplattetes Erscheinungsbild. Die mittlere Zone – die Übergangsschicht – zeigt hingegen Zellen, die abgerundet sind und eher zufällig angeordnet erscheinen. In der Radiärschicht sind die Zellen säulenartig und senkrecht zur Oberfläche aufgebaut²³ (siehe Abb. 2.4.1).

2.3 Zone des kalzifizierten Knorpels

Diese Zone stellt eine wichtige Übergangsstelle zwischen dem Knorpel und dem darunter liegenden subchondralen Knochen dar. Sie überträgt Kräfte und verbindet den Knorpel mit dem Knochen ²⁶. Kollagene Fasern der Radiärschicht penetrieren die Zone des kalzifizierten Knorpels, und tragen somit zur Funktion bei ²⁴. In der kalzifizierten Zone findet sich Kollagen Typ X, ein nicht-faser-bildendes Kollagen, das von hypertrophen Chondrozyten synthetisiert wird ²⁷. Dieses wurde bisher nur in hypertrophen Knorpeln, wie Wachstumsfugen von fetalen Röhrenknochen und Rippen beschrieben, in dessen Hauptaufgabe die Kalzifikation des Knorpels gesehen wurde ²⁸. Am Übergang der kalzifizierten Zone zum darüber liegenden Knorpel liegt die sogenannte Tidemark, die als kalzifizierte Linie erscheint ¹⁶. Die Tidemark besteht aus runden Chondrozyten, die sich in unkalzifizierten Lakunen befinden ²⁹.

2.4 Subchondrale Knochenplatte und Subchondraler Knochen

Die subchondrale Knochenplatte grenzt direkt an die kalzifizierte Zone des Knorpels an und ist mit dieser eng verbunden. Dies erlaubt die Aufnahme von Kräften die vom Knorpel übertragen werden ³⁰. Die subchondrale, relativ dünne Knochenplatte besteht aus recht dichtem lamellärem Knochen, der Verbindung mit der Markhöhle hat ¹⁶. Der anschließende subchondrale Knochen besteht aus Knochenmark und Spongiosa und enthält außerdem eine Vielzahl an arteriellen Endaufzweigungen, die in Sinusoiden von unterschiedlichem Durchmesser in unregelmäßiger Verteilung enden ³⁰.

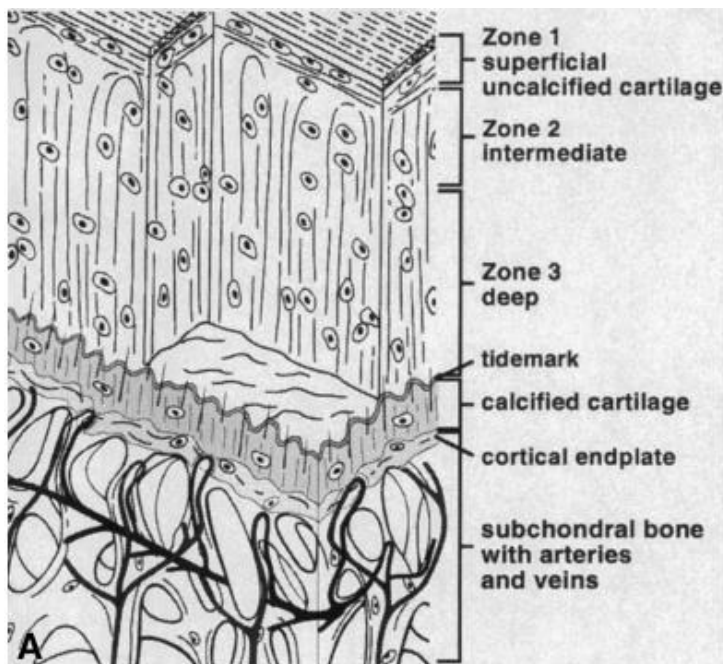


Abb. 2.4.1: Darstellung der Schichten des Knorpels, der Tidemark, der kalzifizierten Zone des Knorpels, der subchondralen Endplatte und des subchondralen Knochens ³⁰

2.5 Osteoarthritis (OA)

Die Bezeichnung Osteoarthritis (OA) beschreibt den Zustand einer pathologischen Imbalance von degenerativen und regenerativen Prozessen, die das gesamte Gelenk mit seinen benachbarten Strukturen betreffen ²². Gleichzeitig stellt sie die am häufigsten auftretende Form von Arthritis beim erwachsenen Menschen dar ³¹. Der hyaline Gelenkknorpel, der subchondrale Knochen, Knochenmark, Menisken, Bänder, Muskeln und Synovialmembran sind gleichermaßen davon betroffen und in diesen degenerativen Prozess miteinbezogen ³². Der Gelenkknorpel spielt eine wichtige Rolle beim Tragen und Verteilen von Kräften (Druck-, Torsions- und Scherkräfte). Somit fördert jede Änderung dieser Komponenten, wie zB. eine gesteigerte Krafteinwirkung oder eine veränderte Kraftverteilung, die Entwicklung von OA ³¹. Als Folge von abnormen Krafteinwirkungen oder vorangegangenen Traumata des Gelenkknorpels und seinen benachbarten Strukturen, induzieren Chondrozyten durch vermehrte Produktion von Entzündungsmediatoren zu einer erhöhten Synthese von Matrix degradierenden Zytokinen, wie Interleukin-1-beta (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor α (TNF α), eine Imbalance von katabolen und anabolen Prozessen ^{33, 34}. Aufgrund dieser vermehrten Produktion von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid (NO) sowie proinflammatorischen Zytokinen steigern Chondrozyten die Produktion von proteolytischen Enzymen, wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Aggrekanasen ³⁵ –

welche Kollagene und Proteoglykane in ihrer Gesamtheit vermindern und somit zu strukturellen Veränderungen der umliegenden Knorpelmatrix beisteuern und außerdem die vermehrte Produktion von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid (NO) bewirken³⁶. Als Folge dieser Imbalance kommt es im Knorpel vor allem durch den Verlust von Proteoglykanen zu hydro-osmotischen Druckveränderungen und schließlich einem Unvermögen auf die Oberfläche wirkende Kräfte adäquat zu verteilen. Fibrillation der Knorpeloberfläche gefolgt von tiefen Rissen und Umbauvorgängen sowohl von der kalzifizierten Zone als auch vom subchondralen Knochen resultieren²².

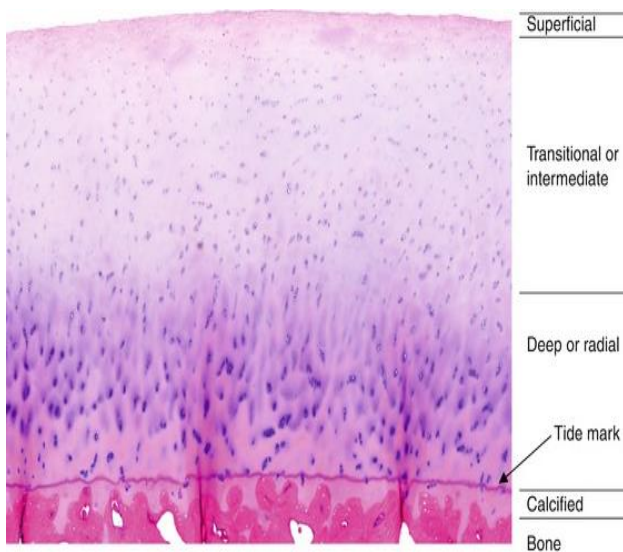


Abb. 2.5.1: Gesunder hyaliner Gelenkknorpel²⁹.

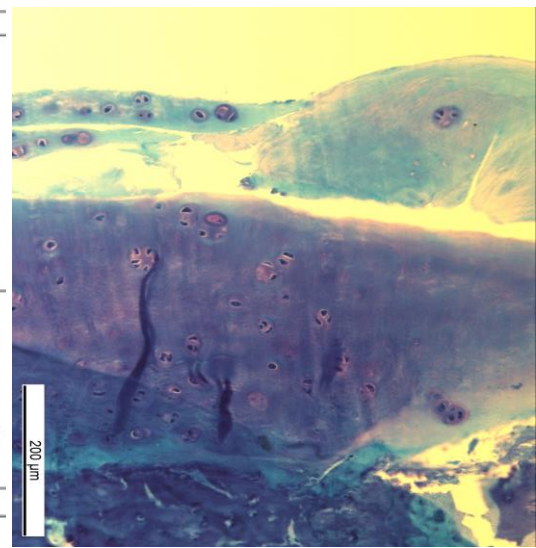


Abb. 2.5.2: Stark geschädigter hyaliner Gelenkknorpel einer Toluidinblau-Färbung (78.13); die Struktur des Knorpels zeigt eine totale Desorganisation, die Zellen zeigen Clusterbildung und eine allgemeine Zellarmut, der Knorpel zeigt vor allem im oberen Bereich eine starke Entfärbung.

2.6 Rolle von subchondralem Knochen und kalzifizierter Zone in der Knorpelregeneration

Die Diffusion wurde lange Zeit als einziger Faktor in der Ernährung des Knorpels beschrieben³⁷ und die Zone des kalzifizierten Knorpels sowie die darunter liegende subchondrale Knochenplatte wurden als impermeable Barrieren betrachtet³⁸. Verschiedene Studien zeigten jedoch, dass diese Kompartimente keineswegs undurchdringbar sind und lassen die Vermutung eines Stoffaustausches zu, der eine

Ernährung des Gelenkknorpels vom subchondralen Knochen aus gewährleisten könnte^{14-17, 39, 40}.

2.6.1 Möglichkeiten zum Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten

Hohlmdahl und Ingelmark zitierten in ihrer Studie von 1950 Petersen, der bereits 1930 feine Kanäle beschrieb, die von der Markhöhle des Knochens bis in den Gelenkknorpel reichten¹⁷. Die Existenz von jenen feinen penetrierenden Kanälen konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden^{16, 39, 40}. Durch diese Kanäle konnte die Diffusion von kleinen Molekülen (Sodium Fluoreszein, 376 Da) zwischen Knochenmark und dem Gelenkspalt in einer Studie an Mäusen mit Fluoreszenz-Färbung nachgewiesen werden⁴¹. Diese Studien suggerieren somit eine Möglichkeit zum Austausch von kleinen Molekülen zwischen subchondralem Knochen und Gelenkknorpel bei kleinen Säugetieren. Um diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragen zu können, bedarf es Studien mit größeren Säugetieren. Eine Studie an Pferden konnte den Transport von gelösten Teilchen (ca. 400 Da) durch die Tidemark und die Zone des kalzifizierten Knorpels nachweisen¹⁵. Auch die Diffusion von größeren Molekülen (66.5 kDa und 12.3kDa) im Zusammenhang mit verstärkter wechselnder Beanspruchung des Gelenks konnte durch verschiedene Studien nachgewiesen werden^{42, 43}.

Die Möglichkeit eines gesteigerten Flüssigkeitsaustausches zwischen Knochen und Knorpel ist während einer Osteoarthritis verstärkt zu beobachten, wodurch auch ein gesteigerter Austausch von Mediator-Stoffen vermutet wird^{38, 44}.

Diese gesteigerte Diffusion steht im direkten Zusammenhang mit vermehrter Knorpelabnutzung und einer gesteigerten Porosität der subchondralen Knochenplatte und zunehmender Gefäßeinsprossung^{45, 46}. Die Porosität der subchondralen Knochenplatte und die Vaskularisation resultieren aus Osteoklastenaktivität, mikroskopisch sichtbar durch „cutting cones“, die vom subchondralen Knochen her den nicht-mineralisierten Knorpel penetrieren^{14, 44, 46}.

Obwohl der Transport von sowohl kleinen als auch weitaus größeren Molekülen durch diese diversen Studien beschrieben wurde^{15, 41-43} und die Vermutung einer Kommunikation zwischen dem subchondralen Knochen und dem Gelenkknorpel weiter bestärkt, ist der direkte Transport von Signalmolekülen durch diese Kanäle noch nicht eindeutig bewiesen.

2.6.2 Hinweise für Osteoblasten-Chondrozyten-Kommunikation

Die Möglichkeit zum Stoffaustausch und zur Kommunikation zwischen Knorpel und subchondralem Knochen wurde eingehend beschrieben, doch wie wird diese Kommunikation auf zellulärer Ebene induziert?

Verschiedene *ex vivo* und *in vitro* Studien geben Hinweise darauf, dass Ereignisse im subchondralen Knochen den darüber liegenden Gelenkknorpel beeinflussen. Eine Studie, die dies bekräftigt beschäftigte sich mit kultivierten bovinen Knorpel-Explantaten. Hier konnte nach sieben Tagen in der superfizialen Zone des Knorpels ein gesteigerter Zelltod der Chondrozyten verzeichnet werden, wenn der subchondrale Knochen nicht vorhanden war ⁴⁷. Auch eine Co-Kultur-Studie konnte Rückschlüsse auf eine Osteoblasten-Chondrozyten-Kommunikation nachweisen. Hier zeigten Chondrozyten neben Osteoblasten aus sklerotischen Bereichen des subchondralen Knochens eine verminderte Produktion des Matrix-Proteins Aggrecan und im Gegenzug eine gesteigerte Expression von Matrix-Metalloproteinase 3 und 13 ⁴⁸. Diese Resultate, wenngleich nur durch *in vitro*-Studie bestätigt, lassen darauf schließen, dass sich Osteoblasten und Chondrozyten im Falle einer OA durch die Expression spezifischer Moleküle gegenseitig beeinflussen. Um eine gegenseitige Wechselwirkung im Zuge einer OA zwischen den beiden Kompartimenten *in vivo* zu untersuchen haben sich zwei Studien-Modelle etabliert. Eine Möglichkeit ist eine OA zu verursachen indem entweder Knochen oder Knorpel geschädigt wird und anschließend dadurch bedingte spezifische osteoarthritische Veränderungen im jeweils anderen Kompartiment gefunden werden können. Ein mögliches Beispiel hierfür ist die Schädigung des Knorpels von Mäusen mittels intraartikulärer Injektion von endotheliale vaskulären Wachstumsfaktor (VEGF) ⁴⁹, dessen erhöhte Konzentration in allen Geweben von osteoarthritischen Gelenken gefunden werden kann ⁵⁰. Hier konnten nach Schädigung des Gelenkknorpels osteoarthritische Veränderungen in allen dem Gelenk benachbarten Geweben einschließlich des subchondralen Knochens gefunden werden ⁴⁹.

Eine andere Methode ist die Behandlung von bestehender OA, die ein Kompartiment betrifft – für gewöhnlich den Knochen - und in protektiven Reaktionen im anderen Kompartiment resultiert – gewöhnlich im Knorpel ³⁸. Ein Beispiel wäre der Einsatz des Wnt-Inhibitors Dkk-1. Wnt sind Lipid-modifizierte Glykoproteine, die an der Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind und die sowohl selbst als auch deren Inhibitoren eng mit dem OA-Komplex assoziiert sind ⁵¹. Der therapeutische Effekt von Dkk-1 wurde in einer Studie an Mäusen untersucht. Durch Destabilisierung

des medialen Meniskus wurde eine OA ausgelöst, um anschließend durch eine Überexpression von Dkk-1 Effekte auf den Knorpel zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass osteoarthritische Manifestationen im Gelenk durch Überexpression von Dkk-1 in Chondrozyten signifikant gehemmt wurden ⁵².

All diese genannten Studien und noch etliche weitere stützen die Annahme einer engen Wechselbeziehung zwischen Knorpel und subchondralem Knochen und der Möglichkeit einer aktiven Kommunikation dieser beiden Kompartimente. Doch wie verhält es sich mit der Knorpelregeneration?

2.6.3 Knorpel-Knochen-Kommunikation in der Knorpelregeneration

Obwohl der Knorpel mangelhafte Fähigkeit zur Regeneration aufzuweisen scheint, konnten in diversen Studien Zellen nachgewiesen werden, die Stammzell-Eigenschaften aufwiesen ^{53, 54}. Stammzellen sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit sich selbst zu erneuern und sich zu unterschiedlichen Zellen weiter zu differenzieren ⁵⁵. Aufgrund dieser Eigenschaften wird davon ausgegangen, dass diese vom Knorpel abstammenden Stammzellen eine Rolle bei Reparationsprozessen von geschädigtem Gelenkknorpel spielen ¹³. Koelling et al. beobachteten diese Stammzellen in Bereichen des Knorpels, wo sich Reparationsprozesse abspielten. Sie mutmaßten, dass diese entweder lokale Zellen darstellen, oder von benachbartem Knochengewebe eingewandert sein könnten ¹³. Diese Einwanderung von Knorpel-Vorläuferzellen in den Knorpel wurde in älteren Studien unter der Voraussetzung, dass die Läsionen des Knorpels auch den subchondralen Knochen penetrieren und somit eine Verbindung zum Knochenmark besteht, begründet ^{56, 57}. Im Zuge einer fortschreitenden OA bewirkt eine verstärkte Osteoklastenaktivität die Penetration des nicht-mineralisierten Knochens und somit eine verstärkte Kommunikation von Knorpel und subchondralem Knochen ^{14, 44, 46} woraus auch eine mögliche Route für das Einwandern von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entstehen könnte. Auch Versuche, die sich mit der Transplantation von mesenchymalen Stammzellen beschäftigten, bestätigten den positiven Effekt auf die Regeneration des Gelenkknorpels ^{58, 59}.

Diese potenzielle Einwanderung von Zellen des subchondralen Knochens konnte auch an unserer Abteilung vor kurzem im Zuge einer Dissertation nachgewiesen werden (Diss Serah Saitowitz, Publikation in Vorbereitung, 2018). Dort konnte in einem osteochondralen Explant-System nachgewiesen werden, dass die Zellen in der

kazifizierten Zone lebend sind und sich je nach Behandlung mit chondroprotektiven oder regenerierenden Substanzen in der kalzifizierten Zone vermehren.

2.7 Chondroprotektive Therapieansätze bei OA

2.7.1 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs)

Die Applikation von chondroprotektiven Supplementen oder anti-inflammatorischen Medikamenten können den Prozess in osteoarthritischen Gelenken teilweise verzögern bzw. den dadurch entstehenden Schmerz verringern. Der entzündungshemmende Effekt von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) basiert auf ihrer Fähigkeit das Enzym Cyclooxygenase (COX) zu hemmen und somit auch gleichzeitig die Prostaglandinsynthese zu verhindern ⁶⁰. Aus diesem Grund findet diese Gruppe von Arzneimitteln sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin bei der Behandlung von entzündlichen Prozessen und Schmerzen jeglicher Art Verwendung. Frean et al. konnten in ihrer Studie beispielsweise zeigen, dass die Gabe von Carprofen in niedrigen Konzentrationen einen positiven Effekt auf die Knorpelheilung hat ⁶¹. Auch Blot et al. konnten bei humanen osteoarthritischen Knorpeln beobachten, dass die Verabreichung von Meloxicam und Acelofenac die Synthese von Proteoglykanen und Hyaluronsäure, die maßgeblich für die Trageigenschaften des Knorpels mitverantwortlich sind, steigert ⁶².

2.7.2 Transdermale Applikation

Es ist allgemein bekannt, dass die systemische Applikation von NSAIDs oft mit Nebenwirkungen, wie zB. Schädigung des Gastrointestinal Traktes, Magengeschwüren oder Nierenversagen, vergesellschaftet ist ^{63, 64}. Um die Gefahr von Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten, bietet es sich an, auf alternative Formen der Applikation von NSAIDs zurückzugreifen. Eine mögliche Alternative bietet hierbei die transdermale Applikation mit speziell hierfür entwickelten Applikationssystemen, wie beispielsweise Vetdrop® (MedDrop Technology AG, Thundorf, Schweiz). In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass mit diesem System zur transdermalen Applikation, ausreichende Konzentrationen von NSAIDs, wie Carprofen und Diclofenac, in das Gelenk verbracht werden können. Außerdem war eine länger anhaltende, stabile Konzentration von Carprofen, die darüber hinaus nach jeder Applikation anstieg, im Gelenk zu beobachten. Wohingegen Tiere, die intravenöse Applikationen von

Carprofen erhielten, nach jeder Gabe hohe Konzentrations-Peaks aufwiesen, die schnell wieder absanken. Weiters konnte gezeigt werden, dass die Degeneration des dem Defekt benachbarten Gelenkknorpels in der Gruppe, die mit dem Vetdrop® System behandelt wurden, reduziert war^{8, 65}.

2.7.2.1 Vetdrop®

Das transdermale Applikationssystem „Vetdrop®“ (MedDrop Technology AG, Thundorf, Schweiz) wurde speziell für die transkutane Applikation von pharmazeutischen Substanzen entwickelt. Das System besteht aus einem Sauerstoffgenerator und einem Applikationssystem, das in Verbindung mit speziell entwickelten Trägersubstanzen verwendet wird. Die Technologie basiert auf einem Sauerstofffluss durch ein Venturi-Ventil und einem computergesteuerten Applikationssystem, welches eine Nanodispersion aus einer Arzneimittelformulierung in diesem Sauerstofffluss erzeugt. Der komprimierte Sauerstoff wird zur Applikationsvorrichtung transportiert. Diese stellt eine Nanodispersions-Vorrichtung dar, die speziell entwickelte Ampullen enthält. Der Sauerstoff treibt die Trägersubstanz und die aktiven Wirkstoffe unter Druck durch die Diffusor Vorrichtung, welche in einem Abstand von 1-2 cm zur Haut gehalten wird (siehe Abb. 2.7.1 - Abb. 2.7.4). Die Kombination aus Sauerstoff und der speziellen Trägersubstanz macht es möglich, die aktiven Wirkstoffe durch die Haut in tiefere Gewebeschichten zu transportieren⁸.



Abb. 2.7.1: Einzelteile des Handstücks



Abb. 2.7.2: Hinteres Handstück mit Ampulle



Abb. 2.7.3: Monitor und Handstück des transdermalen Applikationssystems Vetdrop®



Abb. 2.7.4: Sauerstoffgenerator

2.7.3 Parathormon (PTH)

PTH ist ein Peptidhormon, das aus 84 Aminosäuren besteht und in der Nebenschilddrüse gebildet wird. PTH reguliert den Kalziumhaushalt im Blut. Sinkt die Kalziumkonzentration, so kommt es durch einen negativen Feedback-Mechanismus zur vermehrten Ausschüttung von PTH. Es fördert außerdem die Resorption von Kalzium aus dem Knochengewebe, die Rückresorption aus dem Darm und den Kalziummetabolismus in der Niere.

PTH findet bereits seit längerer Zeit Verwendung in der Behandlung von Osteoporose, um Knochenmasse unterstützend aufzubauen. Hierfür wird das synthetische PTH₁₋₃₄ (34 Aminosäuren) verwendet. Tägliche subkutane Injektionen dieses Hormons konnten die anabole Wirkung auf den Knochen bei Patienten mit Osteoporose nachweisen⁶⁶. Auch

der Einfluss von PTH auf die Regeneration des Gelenkknorpels wurde bereits in einigen Studien untersucht ⁶⁷⁻⁶⁹. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl intraartikuläre als auch subkutane Injektionen von PTH Reparaturmechanismen von Knorpel und subchondralem Knochen stimulieren ^{67, 69}. Lugo et al. konnten außerdem zeigen, dass die Applikation von PTH Synoviopathien verbessert und folglich damit verbundene Knorpelschädigung reduziert ⁶⁸. Das synthetische PTH₁₋₃₄ findet heute als Wirkstoff in Knochenersatzmaterialien zur lokalen Therapie Verwendung. In Vorstudien an einem „Drill hole“ Versuchsmodell an Schafen ⁷⁰ konnte an unserem Institut beispielsweise gezeigt werden, dass PTH₁₋₃₄, das kovalent an ein Hydrogel auf Fibrinbasis gebunden vorlag, einen positiven Einfluss auf die Knochenheilung hat ⁷¹. Diese Tatsachen machen PTH als osteoinduktiven Mediator und chondroprotektives Agens als Therapieform attraktiv.

2.7.3.1 Hydrogele auf Fibrinbasis ⁷²

Die Basis des verwendeten Gels, bildete ein Fibringerüst, das aus Fibrinogen und Thrombin besteht. Mischt man diese beiden Komponenten, so entsteht eine extrazelluläre Fibrinmatrix, womit der letzte Schritt der Gerinnungskaskade nachgeahmt wird. Eine chemisch veränderte und verkürzte Form des humanen Parathormons (PTH₁₋₃₄) fungierte zugesetzt als bioaktiver und osteoinduktiv wirkender Mediator. Kommt es durch das Einwandern von Zellen dann zur Proteolyse des Fibringerüsts, wird das Hormon langsam und intermittierend an die Umgebung abgegeben.

2.8 Evaluierung des Knorpels

2.8.1 Makroskopische Evaluierung

Zur makroskopischen Beurteilung von Knorpelveränderungen empfiehlt die „International Cartilage Repair Society (ICRS)“ ein standardisiertes Verfahren nach Outerbridge, das ursprünglich für die Beurteilung der Chondromalazia Patellae entwickelt wurde ⁷³.

2.8.2 Mikroskopische Evaluierung

Mankin entwickelte bereits 1971 ein System zur mikroskopischen Bewertung von osteoarthritisch verändertem Knorpel – das „histological-histochemical grading system

(HHGS)“⁷⁴. Dieses wird noch heute in abgewandelter Form zur erfolgreich Beurteilung von Knorpelveränderungen herangezogen⁷⁵.

2.8.2.1 Färbemethoden

Toluidin-Blau

Diese Färbemethode basiert auf der selektiven Bindung des Farbstoffes an die Chondroitinsulfate. Die entstandenen Komplexe ändern ihr Farbspektrum – dies wird als Metachromasie bezeichnet. Die Dichte der Färbung steht in direktem Zusammenhang mit dem in der Knorpelmatrix vorhandenen Proteoglykan-Gehalt⁷⁶. Der Proteoglykan-Verlust, der sich bei OA ereignet, beginnt üblicherweise in den oberflächlichen Schichten des Gelenkknorpels⁷⁷ und betrifft später den gesamten Knorpel. Neu gebildete Proteoglykane verfügen über eine geringere Anzahl an Glykosaminoglykanen⁷⁸ – dies spiegelt sich in einer Entfärbung wieder, wenn die Toluidin-Blau-Färbemethode angewandt wird. Dies stellt ein wichtiges Kriterium für die Evaluation des Schweregrades einer OA in der Knorpelbeurteilung dar.

Van Kossa/McNeal

Diese Methode des Färbens besteht aus der van Kossa-Färbung, die mineralisierten Knochen schwarz darstellt, und der McNeal Tetrachrom-Gegenfärbung, die hingegen noch unmineralisierte unreife Knochenvorstufen – die Osteoide – türkisfarben zwischen dem schwarz gefärbten subchondralem Knochen veranschaulicht. Mit dieser Färbung lassen sich auch die Zellen gut anfärben, unter anderem die Osteoklasten.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

In dieser Studie handelte es sich um einen Tierversuch bei dem insgesamt 24 ausschließlich weibliche Schafe der Rasse „Weißes Alpenschaf“ mit einem durchschnittlichen Alter von 2.4 Jahren \pm 0.1 Jahre verwendet wurden. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 75.5 und 41.9 kg und betrug im Durchschnitt 62.0 kg (Tab. 3.1.1).

Tab. 3.1.1: Alter und Gewicht der Versuchstiere

Gruppe	Tiernummer	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)
Diclofenac	78.01	2.30	70.9
	78.02	2.30	49.4
	78.03	2.30	63.9
	78.04	2.30	63.5
	78.05	2.30	64.1
	78.06	2.30	50.5
Kontrolle	78.07	2.30	48.0
	78.08	2.30	66.9
	78.09	2.30	61.8
	78.10	2.30	71.5
	78.11	2.30	65.6
	78.12	2.30	41.9
PTH	78.13	2.40	73.3
	78.14	2.40	75.5
	78.15	2.40	74.3
	78.16	2.40	65.8
	78.17	2.40	66.1
	78.18	2.40	67.5
Valeophyt	78.19	2.50	57.1
	78.20	2.50	57.3
	78.21	2.50	55.8
	78.22	2.50	59.8
	78.23	2.50	59.0
	78.24	2.50	58.0

Alle Tiere wurden vom Staffelegghof der Familie Knüsel (Staffeleggstrasse 874, 5024 Küttingen) bezogen. Um den Gesundheitszustand der Schafe zu überprüfen wurde eine gründliche Untersuchung durchgeführt, die eine Trächtigkeitsuntersuchung, eine Altersbestimmung mittels Zahnuntersuchung und eine Allgemeinuntersuchung, beinhaltete. Anschließend wurden den als gesund befundenen Tieren, zur bestandseigenen Kennzeichnung, Ohrmarken eingezogen und Blut an der Vena jugularis abgenommen um den Maedi/Visna-Titer zu bestimmen. Das Blut wurde am virologischen Institut des Tierspitals Bern untersucht. Nur gesunde Tiere wurden zur Teilnahme an dieser Studie zugelassen.

3.2 Aufbau der Studie

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen zu je sechs Schafen unterteilt. Im Zuge einer Operation wurde im Vorfeld allen Tieren im medialen Bereich des proximalen linken Tibia Schafts ein rechteckiger Defekt (Tibia Slot) gesetzt, welcher mit autogenem Knochenmaterial, oder im Falle der PTH-Gruppe mit Hydroxyapatit (Tricos®, 3.5ml Hydroxyapatite/B-Tricalciumphosphate granules, Biomatlante SARL, 44360 Vigneux de Bretagne, Frankreich) in Kombination mit PTH₁₋₃₄ wieder aufgefüllt wurde. Über einen definierten Zeitraum von drei Monaten erhielten zwei Gruppen transkutane Behandlungen mit einem speziell entwickelten transdermalen Applikationssystem (Vetdrop®, MedDrop Technology AG Thundorf, Schweiz). Bei den hierfür verwendeten Arzneimitteln handelte es sich einmal um eine Lösung mit dem Wirkstoff Diclofenac (DicloHyal®, MedDrop Technology AG, Thundorf, Schweiz) und einmal um eine rein pflanzliche Formulierung (ProValeo2®, MedDrop Technology AG, Thundorf, Schweiz). Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt keine zusätzliche Behandlung postoperativ. Die PTH Gruppe wurde zusätzlich zum Knochenersatz mit PTH₁₋₃₄ in Form eines Hydrogels auf Fibrinbasis (2ml Fibrin: 0.4mg/ml PTH, Artiss®, Baxter AG, 8604 Volketswil, Schweiz) durch intraartikuläre Injektionen behandelt. Nach Ablauf dieser 3 Monate Frist wurden die Tiere auf dem universitätsinternen Schlachthof des Tierspitals Zürich geschlachtet und anschließend Proben für die Auswertung entnommen. Der gesamte Tierversuch wurde unter den in der Schweiz geltenden rechtlichen Bestimmungen durchgeführt und von der kantonalen Tierversuchskommission Zürich genehmigt (Bewilligungs-Nr. ZH165/15).

3.3 Operation

3.3.1 Operationsvorbereitung

Die Versuchstiere wurden ein bis zwei Wochen vor dem geplanten Operationstermin in die entsprechenden Stallungen der MSRU verbracht um sich an das neue Umfeld akklimatisieren zu können. Außerdem wurden die Tiere auf ihren Gesundheitszustand hin gründlich untersucht und eine Blutprobe entnommen, um ein Blutbild präoperativ anzufertigen. Alle Tiere wurden vor dem chirurgischen Eingriff für 24 Stunden gefastet. Die Prämedikation bestehend aus Xylazin (0.1 mg/kg BW, Xylazin Streuli, Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) und Buprenorphin (0.01 mg/kg BW i.m, Temgesic®, Reckitt Benckiser AG, Wallisellen, Switzerland), wurde den Schafen 20–30 Minuten vor

der Operation intramuskulär verabreicht. Außerdem bekamen alle Tiere präoperativ einmalig equines Tetanus-Serum (3000 IU, Tetanus-Serum Intervet, MSD Animal Health, Luzern, Schweiz) s.c. injiziert. Den sedierten Tieren wurde unter aseptischen Bedingungen ein Venenverweilkatheter in die Vena jugularis gesetzt, über welchen, benötigte Medikamente intravenös verabreicht werden konnten. Eine Antibiotikaphylaxe und eine Schmerztherapie wurden präoperativ begonnen und dann vier Tage lang fortgesetzt (insgesamt fünf Tage). Hierfür wurden Procain-Penicillin (30.000 IU/kg BW, BID; Procain-Penicillin Streuli[®] ad us. vet., G. Streuli & CO. AG, Uznach, Schweiz) und Gentamycin (6mg/kg BW, SID; Vetagent[®] ad us. vet., Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) als Antibiotika und Carprofen (4mg/ kg BW, SID, Rimadyl[®], Pfizer, Vertrieb Dr. Graeb AG, Zürich, Schweiz) i.v. verwendet.

Alle Versuchstiere wurden für die Operation in linke Seitenlage verbracht. Das obenliegende rechte Bein wurde nach craniodorsal ausgebunden und das untenliegende Bein, an dem operiert wurde, lag der Tischunterlage auf. Der Operationsbereich wurde mit einer elektrischen Schermaschine von der Wolle befreit und anschließend mit Hibiscrub[®]-Seife vom größten Schmutz befreit. Das Operationsfeld wurde anschließend aseptisch vorbereitet, mit sterilen OP-Tüchern abgedeckt und die Inzisionsstelle mit einer speziellen Inzisionsfolie abgeklebt.

3.3.2 Anästhesie

Die Allgemeinanästhesie wurde über den Venenkatheter mit Diazepam (0.1 mg/kg BW i.v. Valium[®], Roche Pharma AG Kabi AG, Reinach, Schweiz), Ketamin (3-5 mg/kg BW i.v. Narketan[®] 10, Vetoquinol AG, Belp-Bern, Switzerland) und Propofol (0.4-0.6 mg/kg BW i.v. Propofol[®] 1% Fresenius, Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz) eingeleitet.

Um freie Atemwege während der Narkose zu gewährleisten, wurde ein Endotrachealtubus platziert und über diesen die Narkose mit Isofluran (1-1.5 Vol% Attane Isoflurane ad us. vet., Minard INC, Orchard Park, NY, USA) aufrechterhalten. Außerdem diente Propofol als Dauertropf (0.1-0.8 mg/ kg BW/min) noch zusätzlich der Aufrechterhaltung der Allgemeinanästhesie.

Eine Infusion mit Ringer-Laktat (Braun Medical AG, Sempach, Schweiz) wurde mit einer konstanten Infusionsrate von 10ml/kg BW/h über den gesamten Zeitraum der Operation in Form eines Dauertropfes verabreicht.

Eine adäquate Überwachung der Vitalparameter während der Operation, wurde mittels Verwendung von EKG, Kapnograph, Pulsoxymeter und invasiver arterieller Blutdruckmessung gewährleistet.

3.4 Chirurgischer Eingriff

Für den chirurgischen Eingriff wurde nebst dem Standardbesteck, ein Elektrokauter und ein Piezoelektrisches Skalpell (Piezosurgery, Mectron medical technology, Carasco, Italy) verwendet.

Der chirurgische Zugang zur Tibia erfolgte von medial. Hierfür wurde eine Schnitteinzision von ungefähr 8cm im Bereich des proximalen Tibia Schafts gesetzt. Dieser reichte von der Mitte des Kniegelenks auf Höhe der Patella bis zur proximalen Metaphyse der Tibia. Nach Präparation der Haut und der Subkutis bis zum Tibiaplateau wurde die Lage des Gelenkspalts distal des Meniskus und kranial des medialen Seitenbands lokalisiert und mit Kanülen markiert. Hierbei wurde darauf geachtet den hyalinen Knorpel nicht zu verletzen. Anschließend wurde im Bereich des medialen proximalen Tibia Schafts direkt kranial des medialen Seitenbands ein rechteckiger Defekt gesetzt. Um die Lage und Ausmaße des Defekts zu standardisieren, wurde eine speziell entwickelte Schablone benutzt (Abb. 3.4.1). Diese wurde direkt parallel den beiden Kanülen angelegt und garantierte damit einen 4mm distalen Abstand von der Knorpeloberfläche, wenn bei der Defektsetzung den inneren Kontouren gefolgt wurde. Die Maße des Defekts beliefen sich auf 1.5cm Breite, 1cm Höhe und 1.8cm Tiefe. Am inneren Rand wurde mit dem Elektrokauter der Rand klar markiert, die Schablone entfernt und danach entlang den markierten Rändern der Defekt mit dem Piezoelektrischen Skalpell ausgeschnitten, soweit es die Länge des Skalpells erlaubte. Danach wurden mit einem schmalen Osteotom der rechteckige Defekt vorsichtig gelockert und ausgehoben. Der Defekt wurde abwechselungsweise mit dem piezoelektrischen Skalpell und einem scharfen Löffel weiter präpariert bis er die vorgesehenen Ausmaße angenommen hatte. Mit einem Tiefenmessgerät wurde hierbei die Tiefe der Bohrlöcher überprüft (1.8cm). Der hierbei entfernte Knochen wurde bei allen Tieren, bis auf jene die mit PTH behandelt wurden, mit einer Knochenzange zerkleinert und anschließend wieder verwendet um den Defekt aufzufüllen. Der PTH-Gruppe wurde stattdessen ein resorbierbarer Knochenersatzstoff (Tricos®, 3.5ml Hydroxyapatite/B-Tricalciumphosphate granules, Biomatlante SARL, 44360 Vigneux de Bretagne, Frankreich) in Verbindung mit einem Hydrogel auf Fibrinbasis, das PTH₁₋₃₄

beinhaltete, in den Defekt gefüllt. Im weiteren Verlauf wurden Faszie und Subkutis mit je einer fortlaufenden Naht (Vicryl 2/0, Ethicon, J&J) vernäht. Die Haut wurde mit Klammern verschlossen. Auf die Wunde wurde eine Gaze gestapelt, die nach 2 Tagen bereits wieder entfernt wurde.

Im Anschluss an die Operation wurden die Schafe in eine frisch eingestreute Box verbracht, wo ihnen frisches Heu angeboten wurde.

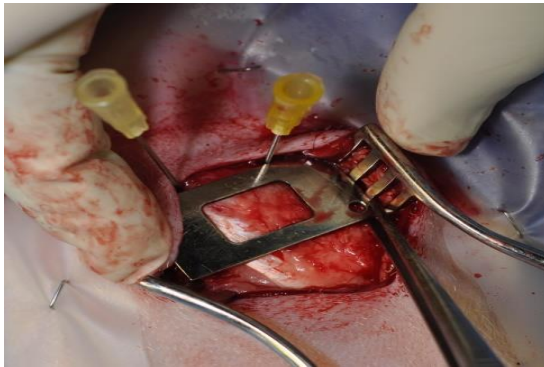


Abb. 3.4.1: Bild der verwendeten Schablone



Abb. 3.4.2: Auskürrettieren des späteren Defekts



Abb. 3.4.3: Darstellung des Tibia-Slots



Abb. 3.4.4: Auffüllen des Defekts mit autogenem Knochenmaterial



Abb. 3.4.5: Hautverschluss mit Klammern

3.5 Postoperatives Management

3.5.1 Diclofenac- und Valeophyt-Gruppe

Die erste Behandlung mit dem Transdermalen Applikationssystem Vetdrop® (MedDrop Technology AG, Thundorf, Schweiz) startete direkt nach dem operativen Eingriff, als die Tiere noch in Narkose waren und wurde dann einmal täglich für eine Dauer von insgesamt 14 Tagen im wachen Zustand fortgeführt. Danach wurde nur noch dreimal pro Woche behandelt. Für die Therapie wurden die Schafe in eine sitzende Position verbracht und die Haut vor jeder Behandlung mit Ethanol desinfiziert. Die zu behandelnde Fläche belief sich auf ungefähr 10cm² um die Operationswunde herum. Hierfür wurde das Handstück in einem Abstand von ca. 1cm in einem Winkel von 90° zur Haut gehalten (siehe Abb. 3.5.1.). Die Dauer der Behandlung war abhängig vom Inhalt der Ampulle und zusätzlich der Umgebungstemperatur und reichte von 3.07 Minuten an warmen Tagen bis hin zu 39.0 Minuten an kalten Tagen. Diese Form der Behandlung wurde bei insgesamt zwei Gruppen angewandt. Einer Gruppe wurde „DicloHyal®“ (MedDrop Technology AG, Thundorf, Schweiz) als speziell entwickelte Formulierung transdermal verabreicht und der anderen Gruppe „ProValeo2®“ (MedDrop Technology AG, Thundorf, Schweiz). DicloHyal ist ein kombiniertes synthetisches Medikament, das aus 6% Diclofenac und 0.5% Hyaluronsäure besteht. Außerdem beinhaltet diese Formulierung noch einige Öl- und Wasserverbindungen, um die tragende Mikroemulsion zu bilden. ProValeo2® dagegen ist ein phytopharmazeutisches Produkt, das aus Kurkuma/Curcumin, Kumin, Bernsteinsäure und Chito-Oligosacchariden als Wirkstoffen besteht. Sowohl DicloHyal® als auch ProValeo2® sind Produkte, die eigens für die transdermale Applikation von MedDrop Technology AG (Thundorf, Schweiz) entwickelt wurden.



Abb. 3.5.1: Behandlung mit Vetrop®

3.5.2 Kontrollgruppe

Diese Gruppe erhielt nach der Operation, abgesehen von der allgemein verabreichten Antibiotikaphylaxe und der Schmerzmedikation in den ersten vier Tagen, keine zusätzliche Behandlung.

3.5.3 PTH-Gruppe

Den Versuchstieren dieser Gruppe wurde intraoperativ, nach Setzen des Defektes, Hydroxyapatit - ein resorbierbarer Knochenersatzstoff, bestehend aus Tricalciumphosphat-Granula (Tricos®, 3.5ml Hydroxyapatite/B-Tricalciumphosphate granules, Biomatlante SARL, 44360 Vigneux de Bretagne, Frankreich) in Verbindung mit einem Hydrogel auf Fibrinbasis, das PTH beinhaltete (0.4mg/ml PTH, Artiss®, Baxter AG, 8604 Volketswil, Schweiz), in den Bereich des Defekts gefüllt. Zusätzlich erhielten die Tiere direkt nach der Operation eine intraartikuläre Injektion dieses Gels, die vier Wochen postoperativ und vier Wochen vor der geplanten Schlachtung wiederholt wurde.

3.5.4 Fluoreszenz-Marker

Um eventuell stattgefundene Umbauprozesse im subchondralen Knochen darstellen zu können wurden drei spezifische Fluorchrom-Farbstoffe zu unterschiedlichen Zeitpunkten postoperativ s.c. injiziert. Calcein grün (5mg/kg BW, Fluka AG, Buchs, Schweiz) wurde vier Wochen postoperativ, Xylenol orange (90mg/kg, BW Fluka AG, Buchs, Schweiz) vier Wochen vor der Schlachtung und Oxytetracyclin (20mg/kg,

Engemycin® 10% ad us.vet., MSD Animal Health, Luzern, Schweiz) drei Tage vor der Schlachtung verabreicht.

3.5.5 Synovialflüssigkeit

Allen Tieren wurde vier Wochen postoperativ in Sedation (Butorphanol: 0.4mg/kg Alvegesic® 1% ad us. vet. Injektionslösung, Virbac AG, Glattbrugg, Schweiz und Medetomidin: 15-20ug/kg Dorbene® ad us. vet. Injektionslösung, Dr. E. Graeb AG, Bern, Schweiz – beides in einer Mischspritze i.m.) und unter Ultraschallkontrolle Synovia aus dem Kniegelenk der operierten Gliedmaße entnommen und in Eppendorf-Gefäßen anschließend tiefgefroren.

3.6 Probenaufarbeitung und –auswertung

3.6.1 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Nach insgesamt zwölf Wochen wurden die Versuchstiere auf dem universitätseigenen Schlachthof des Tierspitals Zürich geschlachtet und unmittelbar danach die Tibia der linken Hintergliedmaße unter Schonung des Kniegelenks herausgetrennt und freipräpariert. Diese wurde vor Ort makroskopisch auf Veränderungen des Knorpels im Bereich des medialen und lateralen Tibiaplateaus, sowie des medialen und lateralen Condylus des linken Femurs untersucht. Makroskopische Veränderungen wurden fotografisch dokumentiert (Nikon, Digital Reflex Kamera D 5000). Außerdem wurden zur Darstellung der Mikrostruktur Röntgenaufnahmen mittels Faxitron (Faxitron X-Ray System Model LX-60, Serial Number 2325A0139) angefertigt. Knochenblöcke, bestehend aus dem ursprünglich gesetzten Defekt und dem darüber liegenden hyalinem Gelenkknorpel wurden ausgesägt und in 40% Alkohol fixiert.

3.6.2 Histologie

Die Proben wurden zuerst entwässert, indem sie sukzessive mit Alkohol in steigender Konzentration durchtränkt wurden. Anschließend wurden sie unter Vakuum in Xylen entfettet und danach in Methylmetaacrylat eingebettet. Mit einer Präzisionssäge (Leica SP 1600) wurden im Anschluss Dickschnitte von 40-50um angefertigt. Von diesen Schnitten wurden im ungefärbten Zustand mittels Faxitron Röntgenaufnahmen gemacht (Faxitron X-Ray System Model LX-60, Serial Number 2325A0139, Time 999, 55 Kv) bevor diese auf opale Objektträger mit Schnellkleber (Cementit CA-12, Merz+Benteli

AG, Niederwangen, Schweiz) geklebt wurden. Zur Anfertigung der Dünnschnitte von 5µm wurde ein Mikrotom (Leica RM 2155; Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) verwendet.

Bei den Dickschnitten wurde mit Toluidinblau eine Oberflächenfärbung angefertigt, Dünnschnitte hingegen wurden nach dem Entplasten sowohl mit Toluidinblau als auch mit einer von Kossa McNeal-Färbung gefärbt.

Um Remodeling-Vorgänge evaluieren zu können wurden zusätzlich noch Dickschnitte angefertigt, welche die Verteilung der Fluorchromfarbstoffe im subchondralen Knochen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop darstellen sollten.

3.7 Evaluationsmethoden

3.7.1 Makroskopische Auswertung

Unmittelbar nach der Schlachtung wurden die Knorpeloberflächen der linken Tibia und des Condylus des linken Femurs beurteilt. Hierfür wurde das Evaluationssystem nach Outerbridge herangezogen (siehe Tab. 3.7.1.). Die Knorpeloberflächen wurden jeweils in einen medialen und lateralen Bereich unterteilt, und jeder für sich beurteilt. Die Werte wurden anschließend in eine Excel-Tabelle eingetragen.

Tab. 3.7.1: Makroskopische Knorpelbeurteilung nach Outerbridge

Grad	Beschreibung
0	Normalbefund, intakter Knorpel mit glatter weißer Oberfläche und guter Konsistenz
I	Erweichung der Oberfläche, aber glatt erhaltene Oberfläche ohne Fibrillation
II	Oberfläche aufgefasert mit Einrissen und deutlicher Fibrillation
III	Tiefe Fissuren, Ulcus bzw. Krater mit instabilen oder unterminierten Rändern, subchondraler Knochen nicht erreicht
IV	Vollschicht- Knorpelverlust bis auf den subchondralen Knochen (Knochenglatze)

3.7.2 Histomorphometrische Auswertung

Die Dickschnitte des linken Tibiaplateaus wurden zur histomorphometrischen Auswertung mit einem Makroskop (Leica DMR Z6 APO A 1.0 bzw. 0.5, Leica

Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) in entsprechender Vergrößerung in Verbindung mit einer Kamera (Leica DFC 450) in ein spezielles Bildverarbeitungsprogramm (Image IMS Client) eingelesen. Pro Schnitt wurden insgesamt zehn Bilder in unterschiedlicher Vergrößerung eingezogen. Diese bestanden aus:

- einer Übersichtsaufnahme des ganzen Schnittes (0.5x7.15)
- einer Übersicht des Defektbereiches mit dem darüber liegenden Knorpel (mediales Tibiaplateau) (1.0x10.0)
- einer Übersicht des defektfreien Bereiches (laterales Tibiaplateau) (1.0x10.0)
- einer Übersicht des Defektbereiches mit dem darüber liegenden Knorpel zur Messung der Fläche der Zone des kalzifizierten Knorpels (1.0x12.0)
- Übersicht des Defektbereiches mit dem darüber liegenden Knorpel zur Messung des Durchmessers von der Zone des kalzifizierten Knorpels, Knorpel und der Distanz von Knorpeloberfläche bis proximalem Defektrand (1.0x14.0)
- Detailaufnahmen des Knorpels und der Zone des kalzifizierten Knorpels über dem Defektbereich – diese enthielten drei Aufnahmen, um diesen Bereich bestmöglich darzustellen
- Detailaufnahmen des Knorpels und der Zone des kalzifizierten Knorpels im defektfreien Bereich (1.0x35.0) – diese enthielten zwei Aufnahmen

Alle Aufnahmen des medialen Tibiaplateaus, also jener Bereich der auch den Defekt enthielt, wurden so eingelesen, dass das Tuberculum intercondylare mediale und der äußerste Rand des medialen Tibiaplateaus vernachlässigt wurden und auch in den spezifischen Messungen dann jene Randbereiche nicht miteinbezogen wurden. Nachdem alle Bilder eingelesen wurden, konnten spezifische Messungen vorgenommen werden:

- Fläche der kalzifizierten Zone
- Durchmesser der kalzifizierten Zone
- Durchmesser des Knorpels
- Distanz von Knorpeloberfläche bis proximaler Defektrand
- Distanz von der Tidemark bis proximaler Defektrand

Sowohl die Flächenmessungen der kalzifizierten Zonen als auch die Messung der jeweiligen Durchmesser wurden mit dem in Image IMS Client integrierten Messtools vorgenommen. Die Fläche der kalzifizierten Zone wurde unterteilt und die

Einzelflächen dann addiert um auf die Gesamtfläche zu schließen. Durchmesser der kalzifizierten Zonen wurden an acht Stellen gemessen, die regelmäßig über dem Defekt verteilt waren. Knorpeldurchmesser, die Distanz zwischen Knorpeloberfläche und dem proximalen Defektrand sowie die Distanz zwischen Tidemark und proximalem Defektrand wurden bestimmt, indem ebenfalls in regelmäßigen Abständen über dem Defekt Messungen vorgenommen wurden. Jeweils fünf Messungen wurden hierfür im Durchschnitt herangezogen. Alle Messwerte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

3.7.3 Histologische Auswertung

3.7.3.1 Histologische Auswertung nach Mankin

Für die histologische Auswertung der Dünnschnitte wurde ein modifiziertes Mankin-Scoring-System herangezogen (siehe Tab. 3.7.2), das auf der histologischen und histochemischen Beurteilung des Knorpels beruht.

Tab. 3.7.2: Modifizierter Mankin-Score zur Knorpelbeurteilung

I	Struktur	Grad
	a. normal	0
	b. Oberfläche unregelmäßig	1
	c. Pannus und Oberfläche unregelmäßig	2
	d. Spalt bis in die Übergangsschicht	3
	e. Spalt bis in die Radialschicht	4
	f. Spalt bis in die kalzifizierte Schicht	5
	g. totale Desorganisation	6
II	Zellen	Grad
	a. normal	0
	b. diffuser Zellreichtum	1
	c. Clusters	2
	d. Zellarmut	3
III	Toluidin-O-Färbung	Grad
	a. normal	0
	b. Färbung leicht reduziert	1
	c. Färbung mittelgradig reduziert	2
	d. Färbung stark reduziert	3
	e. keine Färbung sichtbar	4
IV	Integrität der Grenzlinie (Tidemark)	Grad
	a. intakt	0
	b. mit Blutgefäßen durchbrochen	1

Für die Auswertung wurden die Dünnschnitte, die mit Toluidin-Blau gefärbt wurden, verwendet und unter einem Mikroskop (Leica DMR, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) betrachtet. Bereiche, die besonders interessant erschienen, wurden mit einem Mikroskop (Leica DM 6000 B, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) in Verbindung mit einer Digitalkamera (Leica DFC 350FX R2, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) ebenfalls in Image IMS Client in entsprechender Vergrößerung eingelesen und gespeichert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden pro Gruppe sowohl für die Gesamt-Mankin-Grade als auch für die einzelnen Beurteilungsparameter berechnet und auf statistische Signifikanz überprüft.

3.7.3.1.1 Anzahl der „cutting cones“

Im Zuge der histologischen Auswertung wurde für jedes Tier die Anzahl der sogenannten „cutting cones“ bestimmt, die vom subchondralen Knochen her in die kalzifizierte Zone des Knorpels ragten (Abb. 3.7.1). Gezählt wurden nur vollständige „cutting cones“. Jene werden in der Literatur in Verbindung mit Remodeling-Vorgängen des Knochens genannt^{79, 80}. Diese Tunnel entstehen durch den Abbau von geschädigtem Knochen durch Osteoklasten, um im Anschluss mit Osteoblasten wieder aufgefüllt zu werden⁸⁰.

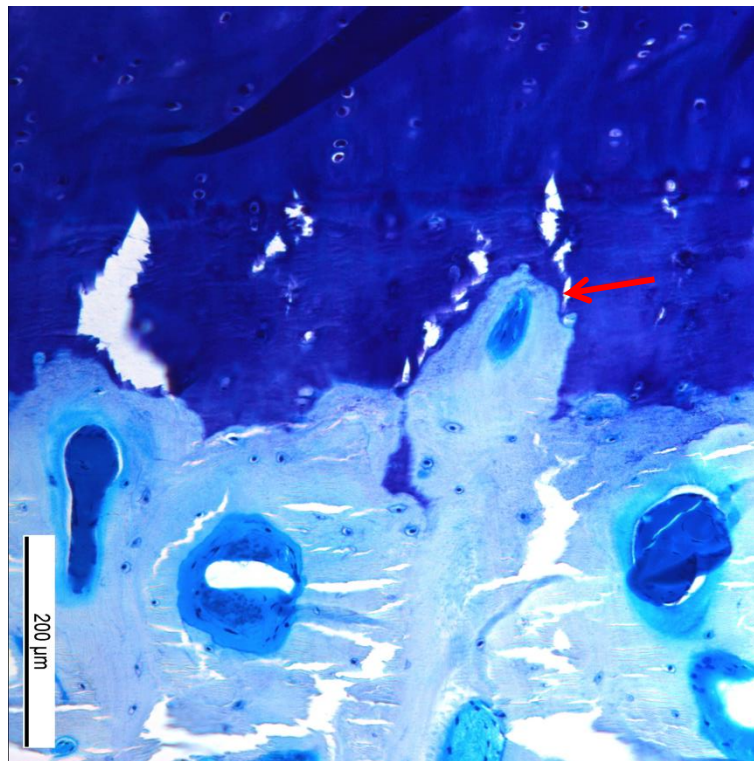


Abb. 3.7.1: „Cutting cone“ (roter Pfeil, 78.09)

3.7.3.2 Histologische Auswertung van Kossa/McNeal

Bei der Betrachtung der Dünnschnitte, die mit van Kossa/McNeal gefärbt wurden, unter dem Mikroskop (Leica DMR, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) fiel auf, dass sich in vielen Fällen Zellen in der Nähe der Tidemark befanden, die kalzifizierte „Kappen“ aufwiesen (Abb. 4.6.1 und Abb. 4.6.2). Daher wurde im Anschluss für jedes Tier jeweils die Anzahl der Zellen bestimmt, die eine solche kalzifizierte Kappe aufwiesen. Für diese Auswertung wurde nur der zentrale Bereich über dem Defekt herangezogen, Randbereiche wurden ausgeschlossen. Außerdem wurde der Abstand dieser Zellen von der Tidemark bestimmt. Als Maß hierfür wurden Zellbreiten angesehen. Ergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle dokumentiert und pro Gruppe die Gesamtanzahl der Zellen mit kalzifizierten Kappen, sowie Mittelwerte für die jeweiligen Unterteilungen der Abstandsmessung berechnet. Interessante Bereiche wurden mittels integrierter Kamera aufgenommen (Leica DFC 350FX R2, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz).

3.7.4 Auswertung der Fluoreszenz-Schnitte

Die Fluoreszenz-Schnitte wurden mit einem speziellen Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM 6000 B, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) in Kombination mit einer

Digitalkamera (Leica DFC 350FX R2, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) in ein dafür entwickeltes Computerprogramm (Leica Application Suite X, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) eingelesen und gespeichert und anschließend die Knochenneubildung im subchondralen Bereich qualitativ bewertet.

3.7.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse, die sich aus der makroskopischen, der histomorphometrischen und der histologischen Beurteilung ergaben, wurde mit Hilfe eines statistischen Computerprogrammes (IBM SPSS Statistics 24) durchgeführt. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Nach Prüfung der Daten auf ihre parametrische Verteilung hin wurden anschließend ein ANOVA- und ein Posthoc Test nach Bonferroni durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Gruppen aufzuzeigen. Ein p-Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant erachtet. Um die einzelnen Parameter auf Zusammenhänge hin zu überprüfen, wurde jeweils noch eine Korrelation nach Pearson berechnet. Gesichert galten Korrelationen bei einem $p < 0.05$.

4 Resultate

4.1 Operation und postoperative Phase

Die Operationen verliefen bei allen 24 Schafen komplikationslos. Lediglich bei einem Schaf wurde durch Abrutschen des Osteotoms eine Tibiafraktur verursacht. Die Defekte konnten mit den verkleinerten Autografts gut ausgefüllt werden. Sowohl das Verbringen des resorbierbaren Knochenersatzstoffes, der PTH₁₋₃₄ und Tricalziumphosphat-Granula beinhaltete, direkt in den Bereich des Defekts als auch die intraartikuläre Applikation des PTH₁₋₃₄-Hydrogels auf Fibrinbasis verliefen problemlos. Ebenso komplikationslos gestaltete sich die Aufwachphase und der Transport zu den Stallungen für alle Tiere. Unmittelbar nach dem Erwachen bewegten sich die Schafe auf vier Beinen mit einer nur leichten Lahmheit und nahmen die Schafe Nahrung auf.

Es konnte bei einer Vielzahl von Tieren im Bereich des Operationszuganges postoperativ ein kleines Serom festgestellt werden, das sich aber bis auf einen Fall, bei dem zusätzlich eine Nahtdehiszenz bestand, innerhalb von 5-10 Tagen zurückbildete. Bei der postoperativen transdermalen Behandlung mit dem Vetdrop®-System waren Anlaufschwierigkeiten zu verzeichnen. Bei den ersten drei Schafen aus der Diclofenac-Gruppe, die transdermal mit dem Vetdrop-System behandelt wurden (78.01, 78.02, 78.03) gab es Probleme mit dem Sauerstoff-Druck am Tag der Operation und einen Tag postoperativ. An diesen Behandlungstagen wurden diese Tiere nur mit 55% anstatt mit 95% Sauerstoff-Druck behandelt. Dieses Problem konnte aber am darauffolgenden Tag behoben werden, sodass das Behandlungsschema daraufhin während der gesamten Zeit adäquat durchgeführt werden konnte. Alle Tiere zeigten postoperativ eine leichte Lahmheit der operierten Extremität für durchschnittlich 4 Tage, diese legte sich aber nach einigen Tagen wieder.

4.2 Schlachtung und makroskopische Auswertung

Die Schlachtung an sich verlief in allen 24 Fällen problemlos. Bei der makroskopischen Beurteilung konnten hier in sechs Fällen Frakturen des medialen Tibiaplateaus beobachtet werden. Jeweils ein Fall konnte in der Diclofenac- (78.04) und PTH-Gruppe (78.16) beobachtet werden und jeweils zwei Fälle in der Kontroll- (78.07 und 78.08) und der Valeophyt-Gruppe (78.22 und 78.24). Die Menge der Synovia war in der PTH-Gruppe bei drei Tieren erhöht (78.13, 78.14 und 78.16), ein Tier zeigte keine

Synovialflüssigkeit (78.15), ein Tier wenig (78.18) und in einem Fall wurden hierzu keine Angaben gemacht (78.17). die Viskosität war bei vier Tieren dieser Gruppe herabgesetzt und zeigte außerdem ein blutiges Erscheinungsbild (78.13, 78.14, 78.16, 78.17). Außerdem gab es in der PTH-Gruppe fibrinöse Auflagerungen im Bereich des medialen Tibiaplateaus bei vier Tieren (78.14, 78.16, 78.17, 78.18). In vier Fällen konnte die Granula der speziellen PTH-Formulierung in der Subkutis gefunden werden (78.14, 78.15, 78.17, 78.18), die dort nur in einem Fall eine Entzündungsreaktion angesprochen als Granulom - verursachten (78.15). Nichtsdestotrotz verheilte der Defekt an sich in den meisten Fällen gut. Die Synovia des Kniegelenks der operierten Gliedmaße der Tiere in den anderen Gruppen stellte sich in physiologischer Menge, Viskosität und Aussehen dar.

4.3 Makroskopische Beurteilung des Knorpels

4.3.1 Deskriptive Bewertung des Knorpels

Bei der makroskopischen Beurteilung der Knorpeloberflächen zeigten sich in den verschiedenen Gruppen gewisse Unterschiede. Knorpelveränderungen konnten vor allem im Bereich des medialen Tibiaplateaus - jenem Bereich über dem Defekt - beobachtet werden. Bei den Tieren, welche bereits makroskopisch Frakturen des medialen Tibiaplateaus aufwiesen, war die Knorpeloberfläche deutlich verändert und teilweise aufgerissen (n=6) und sie wurden von der makroskopischen Knorpelbeurteilung ausgeschlossen.

Knorpelveränderungen bei den anderen Tieren zeigten sich in Form von Erweichung der Oberfläche sowie Rissen und Defibrillation. Diese Veränderungen wurden mit dem Beurteilungssystem nach Outerbridge evaluiert.

4.3.2 Auswertung nach Outerbridge

Jene Tiere, die eine Fraktur des Tibiaplateaus aufwiesen, wurden nicht für die Auswertung nach Outerbridge herangezogen. Somit konnten von insgesamt 24 Tieren nur 18 schlussendlich für die Auswertung verwendet werden. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Behandlungsgruppe und die jeweiligen Areale aus den Graden der Auswertung nach Outerbridge berechnet und sowohl grafisch (Abb. 4.3.1) als auch tabellarisch (Tab. 4.3.1) dargestellt.

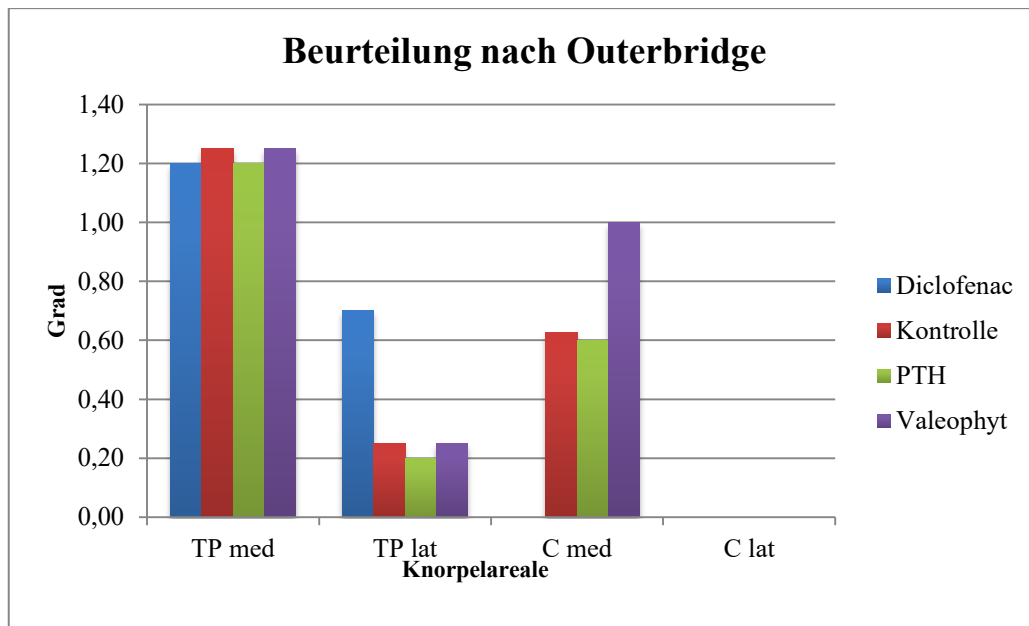


Abb. 4.3.1: Grafische Darstellung der Mittelwerte für die Knorpelbeurteilung nach Outerbridge. TPmed:Tibiaplateau medial, TPlat:Tibiaplateau lateral, Cmed:Femur Condylus medial, Clat:Femur Condylus lateral

Wie in Abb. 4.3.1 ersichtlich ergaben sich bei der makroskopischen Beurteilung des Knorpels nach Outerbridge deutliche Unterschiede in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Ein hoher Outerbridge-Score weist hierbei auf eine größere Schädigung des Knorpels hin. Betrachtet man die Verteilung der Veränderungen des Gelenkknorpels innerhalb der verschiedenen Areale, die für die Beurteilung herangezogen wurden, so wird ersichtlich, dass sich im Bereich des medialen Tibiaplateaus – also jenem Bereich, der direkt über dem gesetzten Defekt lag – die meisten Veränderungen abspielten. Hier konnten bei 94.4% der Schafe Veränderungen beobachtet werden. In 61.1% der Fälle waren Veränderungen des Gelenkknorpels im Bereich des medialen Condylus des Femurs vertreten. Das laterale Tibiaplateau wies bei 44.4% der Tiere eine Schädigung auf und im Bereich des lateralen Condylus des Femurs war in keinem Fall eine Veränderung zu verzeichnen. Vergleicht man die verschiedenen Behandlungsgruppen miteinander und legt das Hauptaugenmerk auf jenes Areal, wo die meisten Veränderungen nachgewiesen werden konnten – also das mediale Tibiaplateau - so wird deutlich, dass in der Kontrollgruppe und der Valeophyt-Gruppe die größten oberflächlichen Knorpelveränderungen zu verzeichnen waren. Dies wird durch die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen verdeutlicht, die bei diesen Gruppen höher lagen als bei den anderen Gruppen. Die Mittelwerte der mit Diclofenac und PTH behandelten Gruppen waren niedriger und wiesen somit im

Durchschnitt geringere Veränderungen der Knorpeloberfläche auf. Sämtliche Mittelwerte und Standardabweichungen, die für die jeweiligen Gruppen und die jeweiligen Areale berechnet wurden, sind in Tab. 4.3.1 dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied war nur im Bereich des medialen Condylus zwischen der Diclofenac- und der Valeophyt-Gruppe zu beobachten.

Tab. 4.3.1: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen für die Knorpelvaluierung nach Outerbridge (TPmed: Tibiaplateau medial, TPlat: Tibiaplateau lateral, Cmed: Femur Condylus medial, Clat: Femur Condylus lateral)

Gruppe	TP med		TP lat		C med		C lat	
	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW
Diclofenac	1.20	±0.25	0.70	±0.20	0.00	±0.00	0.00	±0.00
Kontrolle	1.25	±0.43	0.25	±0.25	0.63	±0.24	0.00	±0.00
PTH	1.20	±0.26	0.20	±0.20	0.60	±0.19	0.00	±0.00
Valeophyt	1.25	±0.25	0.25	±0.25	1.00	±0.20	0.00	±0.00

4.4 Histomorphometrische Beurteilung

Von 24 Tieren konnten 18 Tiere für die histomorphometrische Beurteilung herangezogen werden, da in sechs Fällen eine Fraktur des Tibiaplateaus vorlag und eine adäquate Messung nicht möglich war. Sämtliche Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen, die für die jeweiligen histomorphologischen Parameter berechnet wurden, können aus Tab. 4.6.1 entnommen werden.

4.4.1 Fläche der kalzifizierten Zone des Knorpels

Die Fläche der kalzifizierten Zone des Knorpels wurde bei jedem Tier vermessen und anschließend für jede Gruppe jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die größte Fläche der kalzifizierten Zone war bei der Valeophyt-Gruppe zu beobachten. Die Kontrollgruppe hatte die zweitgrößte Fläche. Gefolgt von PTH- und Diclofenac-Gruppe, die die kleinste Fläche bei der Messung der kalzifizierten Zone aufwiesen. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Medianwerte und Standardabweichungen sind in Abb. 4.4.1 dargestellt.

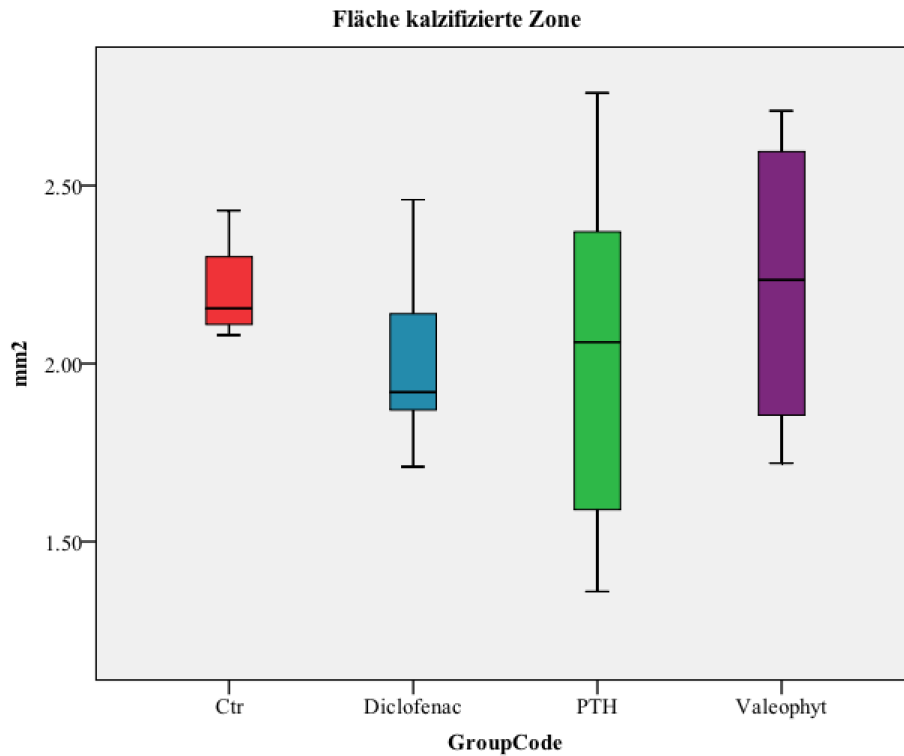


Abb. 4.4.1: Grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und zugehörigen Standardabweichungen der Flächen der kalzifizierten Zone

4.4.2 Durchmesser der kalzifizierten Zone

Der größte durchschnittliche Durchmesser der kalzifizierten Zone des Knorpels befand sich in der Valeophyt-Gruppe. Der zweitgrößte durchschnittliche Messwert lag innerhalb der Diclofenac-Gruppe und den geringsten Wert ließ sich in der Kontrollgruppe und der PTH-Gruppe verzeichnen. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen waren statistisch jedoch nicht signifikant. Eine grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und Standardabweichungen sind aus Abb. 4.4.2 zu entnehmen.

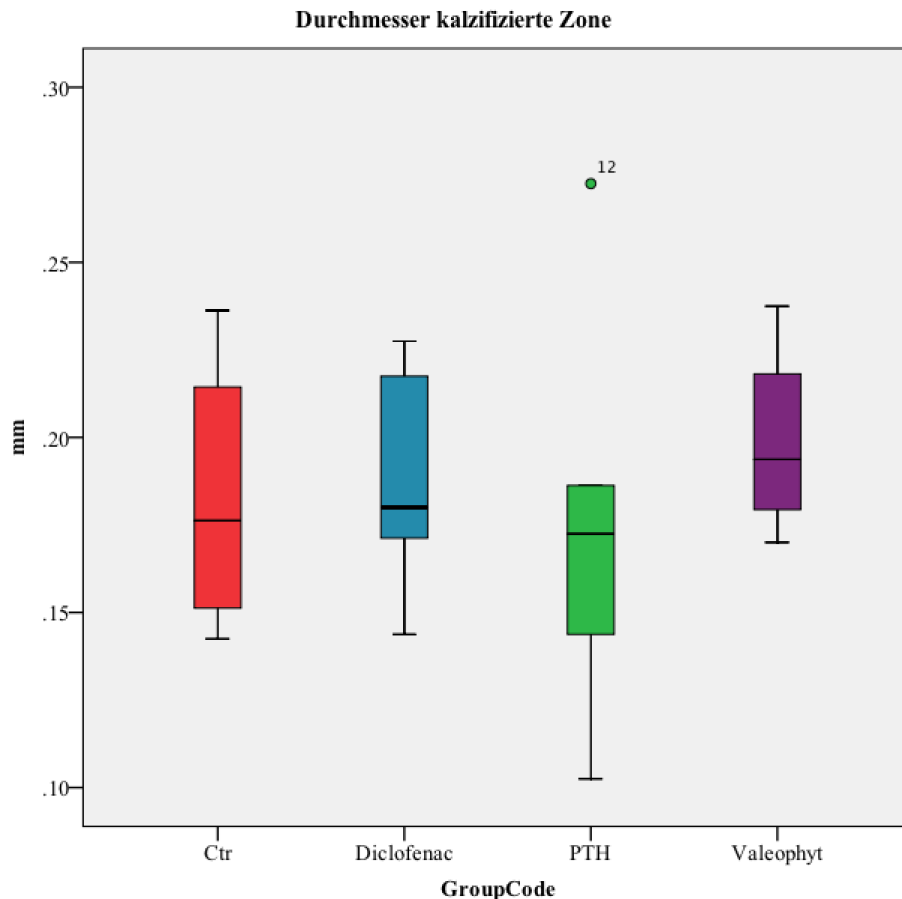


Abb. 4.4.2: Grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und zugehörigen Standardabweichungen der Durchmesser der kalzifizierten Zonen

4.4.3 Durchmesser des Knorpels

Der größte durchschnittliche Knorpeldurchmesser konnte in der Gruppe, die mit Valeophyt behandelt wurde, beobachtet werden. Zweitgrößter Durchmesser lag in der Kontrollgruppe, gefolgt von der Diclofenac-Gruppe. Der kleinste Knorpeldurchmesser war in der Gruppe, die mit PTH behandelt wurde, zu verzeichnen. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bewiesen werden. Eine grafische Darstellung der Medianwerte und Standardabweichungen sind Abb. 4.4.3 dargestellt.

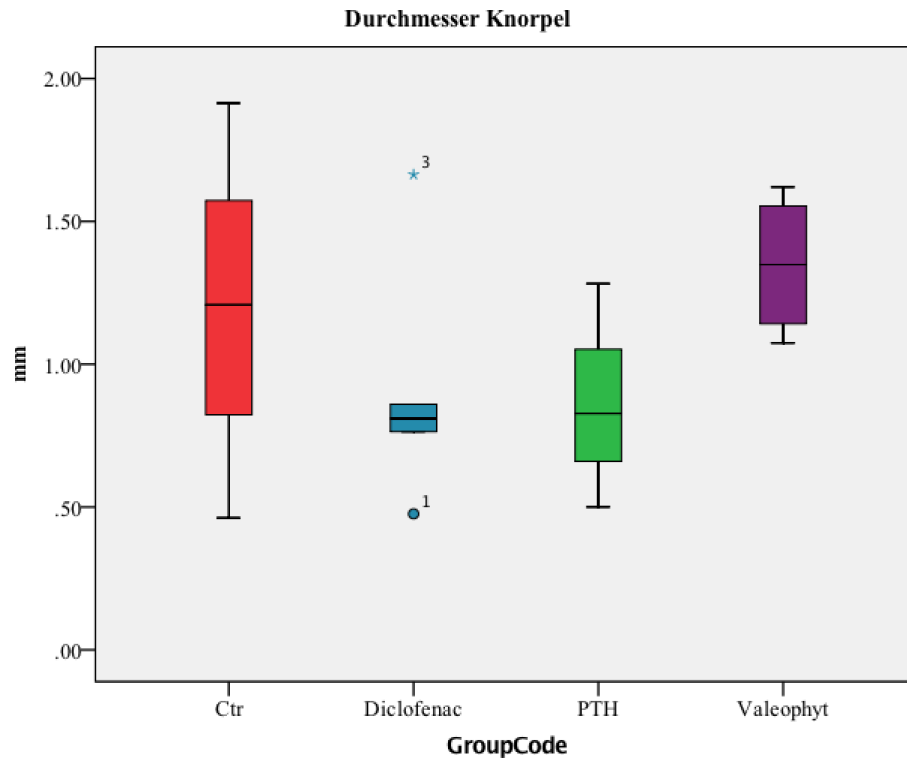


Abb. 4.4.3: Grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und zugehörigen Standardabweichungen der Knorpeldurchmesser

4.4.4 Distanz von der Knorpeloberfläche bis zum proximalen Defektrand

Beim Erfassen der durchschnittlichen Distanz von der Knorpeloberfläche bis zum proximalen Defektrand, konnte in der Valeophyt-Gruppe die größte Distanz beobachtet werden. Die zweitgrößte Distanz war in der Kontrollgruppe zu verzeichnen, gefolgt von der Diclofenac-Gruppe. Die geringste durchschnittliche Distanz lag in der Gruppe, die mit PTH behandelt wurde. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren jedoch nicht statistisch signifikant. Die Medianwerte und Standardabweichungen, die aus den Einzelmessungen berechnet wurden, sind in Abb. 4.4.4 dargestellt.

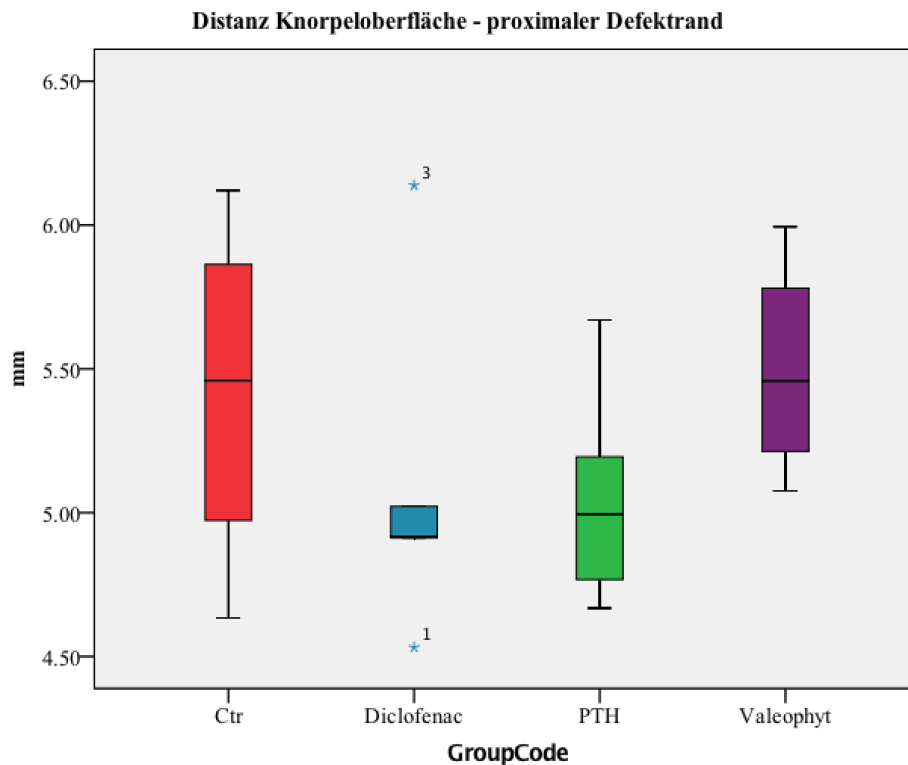


Abb. 4.4.4: Grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und zugehörigen Standardabweichungen der Distanzen von Knorpeloberfläche bis zum proximalen Defektrand

4.4.5 Distanz von der Tidemark bis zum proximalen Defektrand

Die Distanz von der Tidemark (gemessen von der Knorpelbasis) bis zum proximalen Defektrand wurde als zusätzlicher Parameter erhoben, jedoch nicht grafisch angeführt. Dieser Parameter gibt an wie weit entfernt der Defekt vom Knorpel gesetzt wurde. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus Tab. 4.6.1 zu entnehmen. Die größte Distanz konnte hier in der Diclofenac-Gruppe gefunden werden, gefolgt von der Valeophyt- und der Kontrollgruppe. Die geringste Distanz konnte in der PTH-Gruppe beobachtet werden.

4.5 Qualitative Auswertung des subchondralen Knochens mittels Fluoreszenz

Alle 24 Schnitte wurden für die qualitative Auswertung herangezogen.

4.5.1 Calcein grün

Betrachtet man die Fluoreszenz-Schnitte mit dem Channel für Calcein grün, so wird deutlich, dass sich bezogen auf die Remodeling-Aktivität im Bereich des subchondralen

Knochens in der PTH-Gruppe am meisten abspielt. Die Intensität des Fluorchrom-Farbstoffes ist hier im subchondralen Bereich im Vergleich zu den anderen Gruppen am stärksten. Die Diclofenac- und Valeophyt-Gruppe fluoreszieren im Durchschnitt am zweitstärksten im subchondralen Bereich im Vergleich zur Kontrollgruppe, die durchschnittlich die geringste Intensität des Fluorchrom-Farbstoffes subchondral aufweist.

4.5.2 Xylenol orange

Im Channel für Xylenol orange zeigt sich bei allen Gruppen eine geringe Intensität im subchondralen Knochen. Betrachtet man die PTH-Gruppe, so zeigt sich hier nur im Bereich des Defekts eine stärkere Intensität des Fluorchrom-Farbstoffes im Vergleich zu den anderen Gruppen.

4.5.3 Oxytetracyclin

Bei diesem Fluorchrom-Farbstoff verhielt es sich in allen Gruppen ähnlich im Bereich des subchondralen Knochens. Hier zeigten alle Gruppen eine vergleichbar geringe Intensität des Farbstoffes subchondral.

Zusammenfassend ist anhand der Fluoreszenz-Schnitte zu sagen, dass Remodeling-Vorgänge im subchondralen Knochen vor allem in den ersten vier Wochen postoperativ stattgefunden haben. Im Anhang befinden sich Aufnahmen der Fluoreszenzschnitte, die dies veranschaulichen (Abb.10.2.2).

4.6 Histologische Auswertung

4.6.1 Histologische Auswertung nach Mankin

Im Zuge der histologischen Auswertung wurden auch hier Mittelwerte und Standardabweichungen, die sich aus den evaluierten Parametern für die jeweiligen Behandlungsgruppen ergaben, ermittelt. Diese sind in Tab. 4.6.1 dargestellt.

Tab. 4.6.1: Mittelwerte und Standardabweichungen aller erhobenen Parameter

Mittelwerte und Standardabweichungen				
Auswertungsparameter	Kontrolle	Diclofenac	PTH	Valeophyt
Outerbridge (Grad)				
Tibiaplateau medial	1.25 ± 0.43	1.20 ± 0.26	0.90 ± 0.37	1.25 ± 0.25
Tibiaplateau lateral	0.25 ± 0.25	0.70 ± 0.20	0.20 ± 0.20	0.25 ± 0.25
medialer Condylus	0.63 ± 0.24	0.60 ± 0.19	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.20
lateral Condylus	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Histomorphologie				
Fläche kalzifizierte Zone (mm)	2.21 ± 0.08	2.02 ± 0.13	2.03 ± 0.25	2.23 ± 0.23
Durchmesser kalzifizierte Zone (mm)	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.01
Durchmesser Knorpel (mm)	1.20 ± 0.30	0.91 ± 0.20	0.86 ± 0.14	1.35 ± 0.13
Distanz Knorpeloberfläche-Defekt (mm)	5.42 ± 0.31	5.10 ± 0.27	5.06 ± 0.18	5.50 ± 0.19
Distanz Tidemark-Defekt (mm)	3.72 ± 0.56	3.99 ± 0.68	3.68 ± 1.36	3.74 ± 0.85
Anzahl kalzifizierte Zellkappen gesamt	77	92	57	34
Histologie (Grad)				
Mankin gesamt	5.33 ± 2.34	4.67 ± 3.98	6.00 ± 4.73	5.17 ± 3.97
Struktur	2.00 ± 0.63	2.33 ± 2.50	2.67 ± 2.25	2.83 ± 1.94
Zellen	1.17 ± 1.33	0.67 ± 1.03	0.83 ± 1.33	0.50 ± 1.23
Toluidinblau-Färbung	1.33 ± 1.21	1.00 ± 0.89	1.50 ± 1.23	1.17 ± 0.98
Integrität Knorpel-Knochengrenze	0.83 ± 0.41	0.67 ± 0.52	1.00 ± 0.00	0.67 ± 0.52
Cutting cones				
Anzahl gesamt	3	1	3	1

4.6.1.1 Mankin gesamt

Wie in Tab. 4.6.1 ersichtlich, gab es bei der Auswertung nach Mankin – vor allem der Gesamt-Mankin-Grade - in einigen Fällen sehr hohe Standardabweichungen, die für eine eingeschränkte Repräsentativität des jeweiligen Mittelwertes sprechen und auf ausreißende Werte innerhalb der Gruppe hinweisen. Um Ergebnisse bestmöglich interpretieren zu können, wurden deshalb zusätzlich Median und Range berechnet (Tab.

4.6.2), da diese statistischen Parameter weitgehend unabhängig von solchen „Ausreißern“ sind.

Es wird aber versucht diese Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der Gesamt-Mankin-Grade in der Diskussion näher zu erläutern.

Tab. 4.6.2: Median und Range für die Parameter der histologischen Auswertung nach Mankin

	Kontrolle		Diclofenac		PTH		Valeophyt	
	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range
Mankin ges	5.5	6.0	3.0	10.0	3.5	11.0	4.0	11.0
Struktur	2.0	2.0	1.0	6.0	1.5	5.0	2.5	5.0
Zellen	1.0	3.0	0.0	2.0	0.0	3.0	0.0	3.0
Toluidinblau-Färbung	1.5	3.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	3.0
Integrität Knorpel-Knochengrenze	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	1.0

Betrachtet man die Mediane für die Gesamt-Mankin-Grade, die sich aus der Addition der Einzelparameter ergaben, so wird ersichtlich, dass die Kontrollgruppe durchschnittlich die größte Knorpelschädigung aufwies im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen. Allerdings muss festgehalten werden, dass alle Gruppen relativ niedrige Gesamt-Mankin-Grade aufwiesen. Jene Tiere, die mit Valeophyt behandelt wurden, zeigten die zweitgrößte Knorpelschädigung. Eine minimal bessere Knorpelbeschaffenheit im Vergleich zur Valeophyt-Gruppe war in der PTH-Gruppe zu verzeichnen, gefolgt von den mit Diclofenac behandelten Tieren, die im Durchschnitt die geringste Knorpelschädigung innerhalb der Behandlungsgruppen aufwiesen.

4.6.1.2 Einzelparameter Mankin (siehe Tab. 4.6.2)

Struktur

Die größten Veränderungen in Bezug auf die Knorpelstruktur waren in der Valeophyt-Gruppe zu verzeichnen. Die Kontrollgruppe wies eine minimal bessere Struktur des Knorpels auf. Die besten Werte zeigten sich aber in der PTH- und Diclofenac-Gruppe, wobei jene Tiere, die mit Diclofenac behandelt wurden, durchschnittlich die beste Knorpelstruktur im Vergleich zu den übrigen Behandlungsgruppen aufwiesen.

Zellen

Betrachtet man das Zellbild des Knorpels, so zeigten sich in der Kontrollgruppe die größten Veränderungen. Valeophyt-, PTH- und Diclofenac-Gruppe wiesen im Durchschnitt ein ähnliches Zellbild auf.

Toluidinblau-Färbung

Die stärkste Entfärbung des Knorpels war in der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Weniger starke Entfärbung konnte gleichermaßen in der Valeophyt-, der PTH- sowie in der Diclofenac-Gruppe verzeichnet werden.

Integrität Knorpel-Knochengrenze

In Bezug auf die Integrität der Tidemark verhielt es sich in allen Behandlungsgruppen durchschnittlich gleichermaßen.

4.6.1.3 Cutting cones

Die Anzahl der vollständigen „cutting cones“ wurde im Zuge der histologischen Auswertung erfasst und die Gesamtzahl pro Gruppe bestimmt (Tab. 4.6.1). Am meisten vollständige „cutting cones“, die vom subchondralen Knochen her in die kalzifizierte Zone des Knorpels einwanderten, konnten in der PTH- und der Kontrollgruppe dokumentiert werden. In diesen Gruppen waren auch mehrere unvollständige „cutting cones“ zu sehen. Die geringste Anzahl an „cutting cones“ waren in der Valeophyt- und der Diclofenac-Gruppe zu verzeichnen, die exakt dieselbe Anzahl – nämlich einen einzigen vollständigen „cutting cone“ – aufwiesen.

4.6.2 Histologische Auswertung van Kossa/McNeal

4.6.2.1 Quantitative Auswertung der kalzifizierten Zell-Kappen

In der van Kossa/McNeal-Färbung konnten im Bereich des Gelenkknorpels in allen vier Gruppen Zellen beobachtet werden, die kalzifizierte „Kappen“ aufwiesen. Diese konnten in unterschiedlichen Abständen - gemessen in Zellbreiten - von der Tidemark gefunden werden (Abb. 4.6.1 und Abb. 4.6.2).

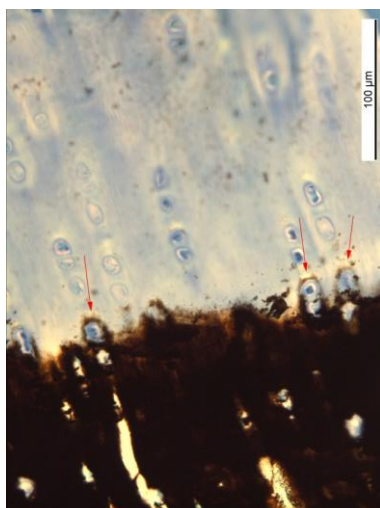


Abb. 4.6.1: „Kalzifizierte Zellkappen“ nahe der Tidemark; Der rote Pfeil zeigt eine „kalzifizierte Zellkappe“; unterer Bildrand (braun/schwarz): kalzifizierte Zone des Knorpels; oberer Bildrand (blau): hyaliner Gelenknorpel

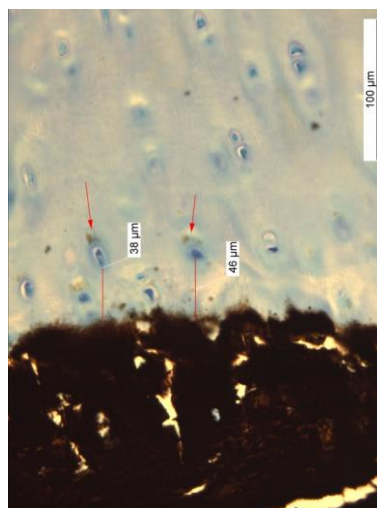


Abb. 4.6.2: „Kalzifizierte Zellkappen“ in unterschiedlichen Abständen von der Tidemark; rote Pfeile zeigen die Zellkappen, rote Abstandslinien die Distanzen

In der Diclofenac-Gruppe konnten insgesamt am meisten Zellen mit kalzifizierten „Kappen“ beobachtet werden. Am zweithäufigsten waren diese in der Kontrollgruppe zu finden, gefolgt von der PTH-Gruppe. Am seltensten traten kalzifizierte „Kappen“ in der Gruppe, die mit Valeophyt behandelt wurde, auf. Betrachtet man die jeweiligen Abstände dieser Zellen von der Tidemark innerhalb der Diclofenac-Gruppe, so fällt auf, dass der größte Anteil hier eine Zellbreite von der Tidemark entfernt zu finden war. Ebenso verhielt es sich in der Kontrollgruppe. In der PTH- und der Valeophyt-Gruppe hingegen war der Großteil dieser überkappten Zellen eine halbe Zellbreite von der Tidemark entfernt lokalisiert. Zellen mit kalzifizierten „Kappen“, die sich mehr als zwei Zellbreiten von der Tidemark entfernt befanden, konnten nur in der Diclofenac- und der Kontrollgruppe verzeichnet werden (Tab. 4.6.3).

Tab. 4.6.3: Auswertung der kalzifizierten „Zell-Kappen“

Gruppe	Zellen ges	0.5 ZB	1 ZB	1.5 ZB	2 ZB	2.5 ZB	3 ZB
Diclofenac	92	31.5 %	44.6 %	1.1 %	18.5 %	2.2 %	2.2 %
Kontrolle	77	24.7 %	45.5 %	14.3 %	7.8 %	2.6 %	5.2 %
PTH	48	45.8 %	39.6 %	2.1 %	12.5 %	0.0 %	0.0 %
Valeophyt	34	58.8 %	23.5 %	2.9 %	14.7 %	0.0 %	0.0 %

4.6.3 Statistisch signifikante Korrelationen

Hierfür wurde die Berechnung nach Pearson herangezogen, bei einem Korrelationskoeffizient von $p < 0.05$ galten Ergebnisse als signifikant. Statistisch signifikante Ergebnisse sind in Tab. 10.1.1 im Anhang nochmals grafisch angeführt.

Durchmesser der kalzifizierten Zone:

Der Durchmesser der kalzifizierten Zone korrelierte mit deren Fläche ($p=0.000$). Je grösser der Durchmesser, desto grösser auch die Fläche. Eine weitere Korrelation zeigte sich in Bezug auf die Integrität der Knorpel-Knochengrenze ($p=0.052$). Ein größerer Durchmesser der kalzifizierten Zone bedeutete eine bessere und somit weniger geschädigte Integrität der Knorpel-Knochengrenze.

Durchmesser Knorpel:

Die Distanz gemessen von der Tidemark bis zum proximalen Defektrand korrelierte positiv mit dem Knorpeldurchmesser ($p=0.039$). Der Knorpel war umso dicker, je grösser die Distanz von der Tidemark bis zum proximalen Defektrand war.

Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen Knorpeldurchmesser und dem Mankin Gesamt-Grad ($p=0.039$) bzw. dem Zellbild des Knorpels ($p=0.014$). Ein größerer Knorpeldurchmesser bedeutete höhere Grade und somit eine größere Knorpelschädigung bzw. stärkere Abweichungen in Bezug auf das Zellbild des Knorpels.

Tibiaplateau medial:

Der Outerbridge-Grad des medialen Tibiaplateaus korrelierte mit dem des lateralen ($p=0.012$). Auch in Bezug auf den Mankin Gesamt-Grad war eine positive Korrelation zu verzeichnen ($p=0.046$). Hohe Outerbridge-Grade bedeuteten auch hohe Mankin Gesamt-Grade, sowie hohe Grade in der Knorpelstruktur ($p=0.046$) und im Zellbild ($p=0.041$) des Knorpels. Somit bestand im Bereich des medialen Tibiaplateaus ein signifikanter Zusammenhang zwischen makroskopischer und mikroskopischer Knorpelschädigung.

Distanz Tidemark bis zum proximalen Defektrand:

Die Distanz gemessen von der Tidemark bis zum proximalen Defektrand korrelierte positiv mit dem Knorpeldurchmesser ($p=0.039$). Der Knorpel war umso dicker, je grösser die Distanz von der Tidemark bis zum proximalen Defektrand war.

Ebenso stand eine größere Distanz in Zusammenhang mit einem höheren Mankin Gesamt-Grad ($p=0.000$), sowie einem höheren Grad in histologischer Knorpelstruktur ($p=0.000$) und Zellbild ($p=0.000$) und außerdem in einer stärkeren Entfärbung des Knorpels ($p=0.000$).

Weiter war ein Zusammenhang zwischen der Distanz der Tidemark bis zum proximalen Defektrand und der makroskopischen Knorpelschädigung im Bereich des medialen Tibiaplateaus zu verzeichnen ($p=0.029$). Umso weiter sich der gesetzte Defekt von der Tidemark befand, umso höher war die makroskopische Knorpelschädigung.

Mankin gesamt:

Ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang zeigte sich im Mankin Gesamt-Grad und dem Knorpeldurchmesser ($p=0.039$). Knorpel mit großem Durchmesser, zeigten in der histologischen Gesamtbeurteilung schlechtere Ergebnisse.

Hohe Grade in weiteren histologischen Parametern, wie Knorpelstruktur ($p=0.000$), Zellbild ($p=0.000$) und Toluidinblau-Färbung ($p=0.000$) korrelierten ebenfalls positiv mit dem Gesamt-Mankin-Grad.

Wie bereits erwähnt standen hohe Outerbridge Grade des medialen Tibiaplateaus in direktem Zusammenhang mit dem Gesamt-Mankin-Grad der histologischen Auswertung ($p=0.046$).

Struktur:

Die strukturelle Schädigung, die sich durch hohe Grade in der histologischen Auswertung darstellte, korrelierte positiv mit dem histologischen Zellbild ($p=0.000$), der Entfärbung des Knorpels ($p=0.008$) und der Gesamtbewertung des Knorpels ($p=0.000$), sowie mit der makroskopischen Knorpelschädigung im Bereich des medialen Tibiaplateaus ($p=0.046$).

5 Diskussion

5.1 Ziel der Studie

In dieser Arbeit wurde durch das Setzen eines subchondralen Defekts eine sekundäre Schädigung des darüber liegenden Gelenkknorpels verursacht. Postoperativ wurden nachweislich chondroprotektive Agentien zur Behandlung in unterschiedlicher Applikationsform eingesetzt und deren Einfluss auf den Knorpel untersucht.

5.2 Das Schaf als Versuchstier

Das Schaf stellte sich für diese Studie als geeignetes Versuchstier dar, da Knochen- und Knorpelheilung durch frühere Studien für diese Spezies hinreichend untersucht wurden^{70, 81} und die anatomischen Unterschiede zum Menschen gering sind¹⁸. Außerdem ist erwiesen, dass Schafe eine Knochen- und Knorpelstruktur besitzen, deren Belastung vergleichbar mit der des Menschen ist, nicht zuletzt durch das ähnliche Gewicht (ca. 50–70kg). Der Eingriff wurde von allen Tieren gut akzeptiert.

5.3 Operation und postoperative Phase

5.3.1 Operationsmethode

Die Wahl der Operationsmethode, die für diese Studie herangezogen wurde – nämlich das Setzen eines Defekts proximal der medialen Tibia-Metaphyse – hat sich in unserer Abteilung schon in vorangegangenen Studien mehrfach bewährt. Durch das Setzen eines subchondralen Defekts, kommt es in 100% der Fälle sekundär zur Degeneration des Gelenkknorpels⁷⁵, was in unserem Labor inzwischen bei >130 Schafen gezeigt werden konnte. Dieses standardisierte Modell des metaphysealen Knochendefektes beim Schaf ist vergleichbar mit den Veränderungen, welche des Öfteren auch beim Menschen nach subchondralen Frakturen beobachtet werden. Daher ist es möglich mit diesem Tierversuchsmodell Rückschlüsse auf die Veränderungen im Knorpel von Menschen zu ziehen.

5.3.2 Operation

Die Operationen verliefen komplikationslos, bis auf eine intraoperativ verursachte Fraktur des über dem Defekt liegenden Tibiaplateaus, die durch das Abrutschen des Osteotoms entstand.

Auch das intraoperative Verbringen des resorbierbaren Knochenersatzstoffes, der PTH₁₋₃₄ und Tricalziumphosphat-Granula beinhaltete, in den Defektbereich verlief erfolgreich. Dieses Produkt wurde von der Firma kostenlos zur Verfügung gestellt, weil offiziell das Datum abgelaufen war und für den Gebrauch bei Menschen somit nicht mehr zugelassen war. Da das Produkt jedoch während der ganzen Zeit bei -80° C gelagert wurde, wurde kein Aktivitätsverlust befürchtet.

5.3.3 Postoperative Phase

Alle Tiere erholten sich gut von der Operation. Lediglich ein Schaf zeigte postoperativ eine erhöhte innere Körpertemperatur und wurde diesbezüglich behandelt (78.24). Die Ursache konnte nicht sicher eruiert werden. Jedoch wurde eine beginnende Pneumonie bedingt durch die Anästhesie und kein Zusammenhang mit der Operation selbst vermutet. Das Schaf kurierte schnell und vollständig und konnte weiter an der Studie teilnehmen.

Die Bildung eines Seroms war in vielen Fällen zu beobachten. Dieses betraf jedoch nur die oberflächliche Hautschicht und bildete sich nach einer gewissen Zeit zurück ohne den Behandlungsablauf zu beeinträchtigen nur ein Schaf, das auch gleichzeitig eine Nahtdehiszenz aufwies, musste vorzeitig geschlachtet werden, da sich die Operationsnarbe infizierte und auch nach mehrfacher Wundauffrischung nicht in den Griff zu bekommen war (78.15).

Trotz Anlaufschwierigkeiten mit dem Vetdrop®-System, konnten Geräteprobleme schnell behoben werden und das Behandlungsregime ohne weitere Vorkommnisse durchgeführt werden.

Die intraartikulären Injektionen des PTH-Hydrogels auf Fibrinbasis gestalteten sich problemlos. Jenes Tier, das vorzeitig geschlachtet werden musste, erhielt eine Injektion weniger als die übrigen Tiere aus der PTH-Gruppe (78.15).

5.4 Probengewinnung und –aufarbeitung

Die Probengewinnung verlief ohne Probleme. Von jedem der 24 Tiere konnten Knochenblöcke ausgesägt werden, die sowohl den ursprünglich gesetzten Defekt als auch den darüber liegenden hyalinen Gelenkknorpel enthielten. Die Anfertigung der Dick- und Dünnschnitte wurden von kompetenten Labormitarbeitern angefertigt und nach standardisierten Verfahren durchgeführt. Lediglich drei der Dickschnitte mussten neu geschnitten werden, da entweder der Defekt oder der Gelenkknorpel nicht richtig

angeschnitten wurde und ansonsten keine adäquate Auswertung hätte durchgeführt werden können.

5.5 Makroskopische Auswertung

In sechs Fällen konnten Frakturen des medialen Tibiaplateaus verzeichnet werden. Eine mögliche Erklärung ergibt sich daraus, dass der Defekt zu nah an den Knorpel gesetzt wurde und dadurch ein Mindestabstand von 4mm zum Knorpel nicht eingehalten wurde. Eine Korrelation zwischen Knorpelschädigung und der Distanz zum Defekt konnte bereits in einer früheren Studie belegt werden ⁷⁵.

In der PTH-Gruppe konnte beim Großteil der Tiere (vier von sechs, inkl. Tibiaplateau-Fraktur) eine vermehrte Menge an Synovia, die eine niedrigere Viskosität und teils blutige Infiltration aufwies, beobachtet werden. Diese Veränderungen waren nur in dieser Gruppe zu verzeichnen, alle anderen Gruppen wiesen keine vermehrte Synovialflüssigkeit im Kniegelenk der operierten Gliedmaße auf. Dies könnte die Folge einer entzündlichen Gelenkreaktion auf die intraartikulären Applikationen per se oder auf das mit PTH angereicherte Hydrogel auf Fibrinbasis sein, das injiziert wurde. Septische Arthritiden sind in der Literatur zwar als sehr seltene Komplikation nach intraartikulären Injektionen beschrieben ^{82, 83}, die sich auch durch aseptische Maßnahmen nicht gänzlich vermeiden lassen ⁸³. Das Risiko einer intraartikulären Infektion könnte jedoch in dieser Studie durch mehrmalige Injektionen und zusätzlicher synovialer Probenentnahme durchaus als erhöht angesehen werden, vor allem in der PTH-Gruppe. Proben der Synovia wurden zwar für jedes Tier entnommen und aufbewahrt, jedoch nicht weitergehend untersucht. Somit lässt sich nicht mit Sicherheit eruieren, woraus diese vermehrte Gelenkfüllung resultierte. Diese könnte auch bakteriellen Ursprungs gewesen sein, allerdings waren klinisch keine Anzeichen einer Infektion zu beobachten. Viel eher scheint eine lokale Reaktion auf das mit PTH angereicherte Hydrogel die Erklärung gewesen sein zumal humanes Fibrin auch eine immunologische Reaktion des Gelenkes hervorgerufen haben könnte. Die fibrinösen Auflagerungen, die ebenfalls in dieser Gruppe vermehrt zu verzeichnen waren, vor allem im Bereich des medialen Tibiaplateaus, könnten aus einer lokalen Reizung durch das Hydrogel resultieren.

5.5.1 Makroskopische Auswertung nach Outerbridge

Makroskopisch sichtbare Knorpelveränderungen waren, wie erwartet, vor allem im Bereich des medialen Tibiaplateaus und des medialen Condylus des Femurs, letzteres als sogenannte „Kissing Lesion“, zu beobachten. Dies zeigt den direkten funktionellen Zusammenhang zwischen Knorpel und subchondralen Knochen auf, der auch in einer früheren Dissertation gezeigt werden konnte ⁷⁵. In der Arbeit von Schubotz (2008) wurde dieselbe Methode angewandt und auch hier resultierte das Setzen eines definierten Defekts im Bereich des subchondralen Knochens in einer indirekten Schädigung des darüber liegenden Gelenkknorpels. Da der Defekt auch in dieser Arbeit im Bereich des medialen Tibiaplateaus gesetzt wurde, war die Schädigung des darüber liegenden Knorpels in diesem Bereich am stärksten ausgeprägt. Somit war die gesamte mediale Abteilung des Kniegelenks stärker vorbelastet, was gleichzeitig in einer stärkeren Schädigung des Knorpels des medialen Condylus des Femurs resultierte. Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zeigten sich Unterschiede im Schweregrad der Veränderungen. Wie in der Hypothese angenommen zeigten jene Gruppen, die mit Diclofenac und PTH₁₋₃₄ behandelt wurden im Durchschnitt geringere Veränderungen der Knorpeloberfläche des medialen Tibiaplateaus im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mittelwerte der Valeophyt-Gruppe waren mit jenen der Kontrollgruppe vergleichbar.

Ein signifikanter Unterschied ergab sich nur zwischen der Diclofenac- und der Valeophyt-Gruppe im Bereich des medialen Condylus des Femurs. Dies lässt sich aber sehr wahrscheinlich darauf zurückführen, dass der durchschnittliche Grad, der sich aus der Bewertung nach Outerbridge ergab, in der Diclofenac-Gruppe mit 0.0 am niedrigsten war und die Tiere der Valeophyt-Gruppe jedoch den höchsten durchschnittlichen Grad in diesem Bereich aufwiesen.

5.6 Histomorphometrische Auswertung

Spezielle Parameter bezogen auf die Morphologie des Knorpels, die sich im Falle einer Degeneration verändern und somit Rückschlüsse auf eine Knorpelschädigung zulassen, wurden hierfür herangezogen. Der Durchmesser des Knorpels und der kalzifizierten Zone des Knorpels, wurden hierbei als wichtig erachtet und im Folgenden diskutiert.

Durchmesser Knorpel:

Ein vermehrter Wassergehalt des Knorpels und eine dadurch bedingte Schwellung, sind als Zeichen einer degenerativen Schädigung des Gelenkknorpels schon länger bekannt und in diversen Studien beschrieben⁸⁴⁻⁸⁶. Auch in dieser Studie konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Knorpeldurchmesser und der Knorpelschädigung nachgewiesen werden. Größere Durchmesser korrelierten positiv mit höheren Mankin-Gesamt-Graden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch im Falle dieser Studie größere Knorpeldurchmesser auf eine Schwellung des Knorpels als Zeichen einer degenerativen Schädigung zurückzuführen sind. Die durchschnittlich größte Zunahme des Knorpeldurchmessers war in der Valeophyt-Gruppe zu beobachten, gefolgt von der Kontrollgruppe. Eine weitaus geringere Schwellung des Gelenkknorpels zeichnete sich in der Diclofenac- und der PTH-Gruppe ab – letztere schnitt hierbei im Durchschnitt am besten ab. Diese Tendenz der besseren Knorpelbeschaffenheit der mit Diclofenac und PTH₁₋₃₄ behandelten Gruppen findet sich, trotz fehlender statistischer Signifikanz, auch in Hinblick auf die histologischen und makroskopischen Ergebnisse.

Durchmesser der kalzifizierten Zone

Degenerative Schädigungen im Zuge einer OA betreffen auch die kalzifizierte Zone des Knorpels. Eine Verbreiterung dieser Zone ist bereits in anderen Studien, die sich mit OA beschäftigten, beschrieben^{87, 88}. In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied im Durchmesser der kalzifizierten Zone des Knorpels nachgewiesen werden. Die Breite unterschied sich zwischen den Gruppen nur minimal. Eine statistisch signifikante Korrelation ergab sich aber aus der Breite der Zone und der Integrität der Knorpel-Knochengrenze. Diese Grenze zeigte mit steigendem Durchmesser der kalzifizierten Zone eine bessere Integrität.

Distanz Tidemark bis proximaler Defektrand

Im Durchschnitt wurde der metaphysale Defekt in einem Abstand von $3.74\text{mm} \pm 0.87\text{mm}$ zum darüber liegenden Gelenkknorpel gesetzt. In einer früheren Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der histologischen Knorpelschädigung und dem Abstand des gesetzten Defektes vom darüber liegenden Knorpel nachgewiesen werden. Je geringer dieser Abstand gewählt wurde, umso größer war die im Anschluss evaluierte Knorpelschädigung⁷⁵. In dieser Arbeit konnte dieser Zusammenhang nicht

erneut nachgewiesen werden, allerdings hielt sich die Varianz des Abstandes auch sehr in Grenzen. In der Studie von Schubotz korrelierte ein kleinerer Abstand sowohl mit einer größeren histologischen als auch makroskopischen Schädigung des Knorpels. Diese kontroversen Ergebnisse könnten mit der simplen Tatsache zusammenhängen, dass die Abstände in der vorliegenden Studie durch eine bessere und standardisierte Operationstechnik nicht mehr gegeben waren. Allerdings könnte dies auch damit zusammenhängen, dass sich diese Arbeit mit verschiedenen Behandlungsgruppen beschäftigte, bei denen chondroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Dadurch könnte der positive Effekt des chondroprotektiven Agens die Knorpelschädigung trotz geringerem Defekt-Abstand vergleichsweise gering gehalten haben.

Qualitative Auswertung

Zusammenfassend ist anhand der Fluoreszenz-Schnitte zu sagen, dass Remodeling-Vorgänge im subchondralen Knochen über die ganze Beobachtungszeit, aber vor allem bei den behandelten Tieren der Gruppen Diclofenac, PTH und Valeophyt in den ersten vier Wochen postoperativ stattgefunden haben (siehe Abb.10.2.2). Die Kontrollgruppe zeigte eine vermehrte Remodelingsaktivität nach zwei oder drei Monaten, also deutlich verzögert. Diese Beobachtung könnte mit der etwas vermehrten Degeneration des Knorpels bei dieser Gruppe zusammenhängen, vor allem, wenn die Hypothese zutrifft, dass die Regeneration des Knorpels von der Zellaktivität im subchondralen Knochen abhängt.

Die vermehrte Remodelingaktivität im subchondralen Knochen belegt auch eine Studie an Ratten mit induzierter OA, die vier bis sechs Wochen postoperativ die stärkste Volumenzunahme im Bereich des subchondralen Knochens zeigten⁸⁹. Dies ist auf dem Channel für Calzein grün am deutlichsten zu erkennen. Calzein ist eine Iminodiessigsäure, die nach Verbindung mit Calcium intensiv grün fluoresziert⁹⁰, wodurch Knochenneubildung sichtbar wird. In der PTH-Gruppe fluoreszierte der Bereich des subchondralen Knochens im Vergleich zu den anderen Gruppen am stärksten. Dies zeigt deutlich, dass hier am meisten Remodeling-Vorgänge stattgefunden haben und die Neubildung von Knochen im subchondralen Bereich am stärksten angeregt wurde. Zurückzuführen ist dies auf die Tatsache, dass PTH osteoinduktive Eigenschaften aufweist. Diese anabole Wirkung auf den Knochen konnte auch durch Studien an Patienten mit Osteoporose gezeigt werden. Durch die

subkutane Injektion von PTH₁₋₃₄ konnte Knochenmasse aufgebaut werden ⁶⁶. Die Stimulation von Reparaturmechanismen im subchondralen Knochen konnte auch durch intraartikuläre und subkutane Injektionen dieses Hormons bewiesen werden ^{67, 69}. Es sollte ebenfalls beachtet werden, dass PTH auch eine Wirkung auf die Mobilisation des Kalziums aus dem Knochen haben kann und deswegen allgemein die Remodelingaktivität im subchondralen Knochen beeinflussen könnte.

Auch in den zwei anderen mit chondroprotektiven Agentien transdermal behandelten Gruppen – nämlich der Diclofenac- und Valeophyt-Gruppe - konnte im Bereich des subchondralen Knochens eine gesteigerte Remodeling-Aktivität gesehen werden. Das in der Valeophyt-Gruppe verwendete Agens „ProValeo2[®]“ ist ein phyto-pharmazeutisches Produkt in Kombination mit Chito-Oligosacchariden. DicloHyal[®] hingegen ist ein kombiniertes synthetisches Medikament, das aus Diclofenac – einem NSAID - und Hyaluronsäure besteht. Ein positiver Effekt auf den subchondralen Knochen durch transdermale Applikation von NSAIDs und Chito-Oligosacchariden konnte auch in einer Studie durch Evaluation mit dem ICRS („Clinical Cartilage Injury Evaluation System“) bestätigt werden ⁸. In dieser Studie zeigten sowohl jene Gruppen die mit NSAIDs, als auch jene Gruppe, die mit der Trägersubstanz in Kombination mit Chito-Oligosacchariden transdermal behandelt wurden im Bereich des Defekts im subchondralen Knochen die gleichen niedrigen Grade. Die positiveren Effekte auf den subchondralen Knochen, die in diesen beiden Studien beobachtet wurden, könnten sowohl auf die Wirkung der applizierten Substanzen, als auch auf den Sauerstoff als Carrier zurückzuführen sein. Es ist durchaus vorstellbar, dass eine vermehrte Sauerstoffzufuhr die Aktivität der Zellen oder sogar deren Proliferation steigern könnte.

5.7 Histologische Auswertung

5.7.1 Auswertung nach Mankin und Bewertung der histologischen Befunde

Die histologische Bewertung nach Mankin wird oft herangezogen, um osteoarthritische Gelenke im fortgeschrittenen Stadium beim Menschen zu evaluieren. Deswegen wird diskutiert, dass er bei milder anfänglicher OA nur begrenzt in der histologischen Auswertung einsetzbar ist ⁹¹. Trotz einiger Schwächen liefert die Auswertung nach Mankin nützliche Ergebnisse im Hinblick auf den hyalinen Gelenkknorpel ⁹². Außerdem sind die Resultate durch Auswertung nach Mankin sehr gut bekannt und interpretierbar, da lange Zeit kein alternatives Evaluationssystem für die Bewertung des

Gelenkknorpels existiert hat ⁹¹. Da sich die Verwendung eines modifizierten Mankin-Scores auch an unserer Abteilung in diversen Dissertationen für die histologische Evaluation des Knorpels bewährt hat, wurde dieser auch für diese Arbeit herangezogen.

Wie in der Hypothese angenommen, zeigten Tiere, die mit chondroprotektiven Substanzen postoperativ behandelt wurden im Durchschnitt eine geringere Schädigung des Knorpels im Vergleich zu Tieren, die keine Behandlung erhielten. Dies spiegelte sich auch in den Einzelparametern der histologischen Auswertung weitestgehend wieder. Die besten histologischen Ergebnisse waren in der Gruppe, die transdermal mit Diclofenac postoperativ behandelt wurde, zu verzeichnen. Der positive Effekt von NSAIDs auf den hyalinen Gelenkknorpel - appliziert via transdermalem Applikationssystem (Vetdrop[®]) – konnte bereits in einer früheren Studie an unserer Abteilung nachgewiesen werden ⁸. Hier zeigten Tiere aus der Gruppe, die postoperativ mit einer Kombination aus Carprofen, Chito-Oligosacchariden und Trägersubstanz transdermal behandelt wurden, die besten histologischen Ergebnisse bezogen auf den hyalinen Gelenkknorpel. Diese Chito-Oligosaccharide sind Derivate von Chitosan, das bereits in diversen Studien als Baustein in der Förderung der Knorpelregeneration genannt wird ⁹³⁻⁹⁷. Dieser positive Effekt von Chito-Oligosacchariden auf die Knorpelregeneration kann auch in der Valeophyt-Gruppe beobachtet werden. Diese Tiere wurden postoperativ transdermal mit „ProValeo2[®]“ behandelt, dessen Inhaltsstoff neben einer phyto-pharmazeutischen Formulierung auch Chito-Oligosaccharide enthält. Der Effekt von dieser phyto-pharmazeutischen Formulierung, wurde bisher in keiner anderen Studie untersucht. Daher ist in dieser Studie der positive Effekt auf den Gelenkknorpel eher auf die Kombination mit Chito-Oligosacchariden zurückzuführen. Um eine mögliche chondroprotektive Wirkung der phyto-pharmazeutischen Formulierung als eigenständiges Agens nachweisen zu können, bedarf es weiterer Studien.

Die Valeophyt-Gruppe zeigte bei der histologischen Evaluation zwar bessere Ergebnisse als die Kontrollgruppe, jedoch wiesen Tiere, die mit PTH behandelt wurden, nach der Diclofenac-Gruppe die beste Knorpelbeschaffenheit auf.

Der Einfluss von PTH auf die Regeneration des Gelenkknorpels wurde bereits in einigen Studien untersucht ⁶⁷⁻⁶⁹. Sowohl intraartikuläre als auch subkutane Injektionen von PTH stimulieren Reparaturmechanismen von Knorpel und subchondralem Knochen ^{67, 69}. Die Applikation von PTH verbessert außerdem Synoviopathien und reduziert

folglich damit verbundene Knorpelschädigung⁶⁸. Das synthetische PTH₁₋₃₄ findet heute als Wirkstoff in Knochenersatzmaterialien zur lokalen Therapie Verwendung. In Vorstudien an einem „Drill hole“ Versuchsmodell an Schafen konnte an unserem Institut beispielsweise gezeigt werden, dass PTH₁₋₃₄, das kovalent an ein Hydrogel auf Fibrinbasis gebunden vorlag, einen positiven Einfluss auf die Knochenheilung hat^{70, 98}. Diese Tatsachen machen PTH als osteoinduktiven Mediator und chondroprotektives Agens als Therapieform attraktiv.

Wie bereits bei den Ergebnissen beschrieben, wurden bei der histologischen Evaluierung des Gelenkknorpels nach Mankin sowohl Mittelwerte und Standardabweichungen, als auch zusätzlich Mediane und Range für den die Gesamt-Mankin-Grade berechnet, da hier in einigen Fällen sehr hohe Standardabweichungen verzeichnet werden konnten. Dies spricht für eine eingeschränkte Repräsentativität des jeweiligen Mittelwertes und weist auf ausreißende Werte innerhalb der Gruppe hin. Um Ergebnisse bestmöglich interpretieren zu können, wurden deshalb zusätzlich Median und Range berechnet (siehe Tab. 4.6.2), da diese statistischen Parameter weitestgehend unabhängig von solchen „Ausreißern“ sind. Die bereits diskutierten Ergebnisse beziehen sich auf die Medianwerte der Gesamt-Mankin-Grade. Betrachtet man hingegen die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen, so fällt auf, dass ausreißende Werte vor allem in der PTH-Gruppe vorliegen (Tab. 5.7.1).

Tab. 5.7.1: Mankin-Gesamt-Grade für jedes einzelne Tier; markierte Tiere zeigten mikroskopisch eine Fraktur des medialen Tibiaplateaus

Tier	Kontrolle	Tier	Diclofenac	Tier	PTH	Tier	Valeophyt
78.07	4.00	78.01	1.00	78.13	13.00	78.19	5.00
78.08	8.00	78.02	2.00	78.14	3.00	78.20	4.00
78.09	7.00	78.03	8.00	78.15	3.00	78.21	2.00
78.10	7.00	78.04	11.00	78.16	11.00	78.22	4.00
78.11	4.00	78.05	4.00	78.17	4.00	78.23	13.00
78.12	2.00	78.06	2.00	78.18	2.00	78.24	3.00
MW und Stabw	5.33 ± 2.34		4.67 ± 3.98		6.00 ± 4.73		5.17 ± 3.97

Auf Grund dieser ausreißenden Werte würde die PTH-Gruppe in der Evaluation des Knorpels an die schlechteste Position rücken (Abb. 5.7.1). Im Vergleich zu den anderen Gruppen sind hier nämlich zwei solche Fälle (78.13 und 78.16) zu verzeichnen, die den Mittelwert erheblich anheben. Dies ist auch an der hohen Standardabweichung ersichtlich.

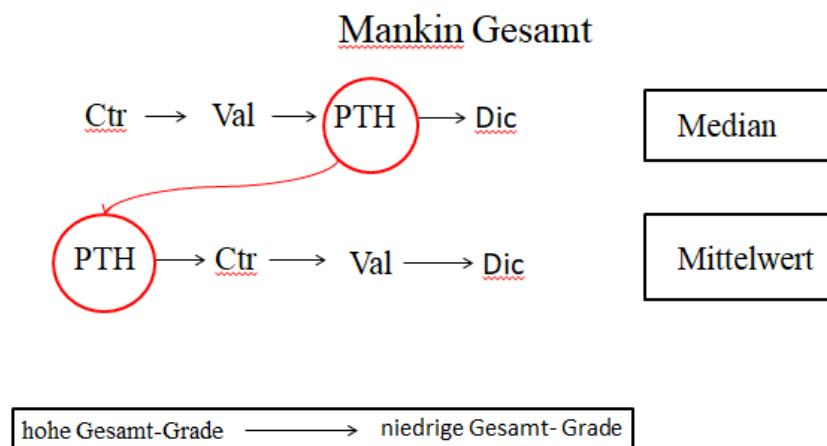


Abb. 5.7.1: Unterschied in der Höhe der Mankin-Gesamt-Grade bezogen auf Median und Mittelwert der einzelnen Behandlungsgruppen

5.7.2 Rolle des subchondralen Knochens in der Knorpelregeneration

Obwohl der Transport von sowohl kleinen als auch weitaus größeren Molekülen durch diversen Studien beschrieben wurde^{15, 41-43} und die Vermutung einer Kommunikation zwischen dem subchondralen Knochen und dem Gelenkknorpel weiter bestärkt, ist der direkte Transport von Signalmolekülen durch diese Kanäle noch nicht eindeutig bewiesen.

Das Mysterium um die Rolle des subchondralen Knochens in der Knorpelregeneration und der damit verbundenen Frage, ob aktive Einwanderung von Zellen aus diesem Kompartiment zur Regeneration beitragen, ist Thema etlicher Studien^{14, 38, 44, 46, 56, 57, 99}. Auch in dieser Arbeit soll die Rolle des subchondralen Knochens in der Knorpelheilung nicht außer Acht gelassen werden.

5.7.2.1 Kalzifizierte „Zell-Kappen“

Im Zuge der Auswertung der mittels van Kossa/McNeal gefärbten histologischen Präparate, zeigten sich Zellen, die sich in unterschiedlichen Abständen von der Tidemark befanden und schwarze, kalzifizierte „Kappen“ aufwiesen. Die Präsenz dieser

„kalzifizierten Zellkappen“ lässt die Vermutung einer möglichen Zelleinwanderung vom subchondralen Knochen in den Gelenkknorpel vermuten. Eine mögliche Erklärung wäre die Einwanderung von Zellen aus dem subchondralen Knochen, die beim Durchtritt durch die kalzifizierte Zone des Knorpels, Reste dieser kalzifizierten Schicht vor sich hergeschoben haben. Im Bereich des Knorpels werden diese dann durch die van Kossa/McNeal-Färbung erst sichtbar. Die Anzahl der „Zellkappen“ war in der Diclofenac-Gruppe am größten. Dies könnte auf eine vermehrte Zelleinwanderung und dadurch bedingte bessere Knorpelregeneration hinweisen, da die Diclofenac-Gruppe auch die besten Mankin-Gesamt-Grade im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen aufwies. Die Anzahl dieser „Kappen“ innerhalb der anderen Gruppen zeigt aber keinen Zusammenhang mit den Ergebnissen der histologischen Bewertung nach Mankin. In der Literatur sind solche „kalzifizierten Zellkappen“ laut meiner eingehenden Recherche noch nicht erwähnt worden. Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass es sich bei diesen „kalzifizierten Zellkappen“ um Artefakte handelt. Dies kann nur durch weitere Studien an histologischen Knorpelpräparaten, die gezielt mit einer van Kossa/McNeal-Färbung bearbeitet werden, ausgeschlossen oder bestätigt werden. Auch kann zu diesem Zeitpunkt nicht evaluiert werden, um was für Zellen es sich hierbei handelt.

Die Annahme einer potenziellen Einwanderung von Zellen des subchondralen Knochens kann durch neueste Erkenntnisse aus einer Dissertation unserer Abteilung gestützt werden (Serah Saitowitz, Publikation in Vorbereitung, 2018).

6 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. 2015. Ageing and health. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/en/>.
2. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-95.
3. Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee*. 2006;13(3):194-202.
4. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, et al. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg*. 1999;28(4):242-55.
5. Insall JN. Intra-articular surgery for degenerative arthritis of the knee. A report of the work of the late K. H. Pridie. *J Bone Joint Surg Br*. 1967;49(2):211-28.
6. Schmidt H, Schulze KJ, Cyffka R. Results of treatment of cartilage damage by Pridie drilling of the knee joint. *Beitr Orthop Traumatol*. 1988;35(3):117-22.
7. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade*. 1999;28(1):26-32.
8. Sidler M, Fouche N, Meth I, von Hahn F, von Rechenberg B, Kronen P. Transcutaneous treatment with vetdrop® sustains the adjacent cartilage in a microfracturing joint defect model in sheep. *Open Orthop J*. 2013;7:57-66.
9. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1993;75(4):532-53.
10. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79(10):1439-51.
11. Wei X, Gao J, Messner K. Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. *J Biomed Mater Res*. 1997;34(1):63-72.
12. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*. 1996;78(5):721-33.
13. Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, et al. Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell*. 2009;4(4):324-35.

14. Boyde A, Firth EC. Articular calcified cartilage canals in the third metacarpal bone of 2-year-old thoroughbred racehorses. *J Anat.* 2004;205(6):491-500.
15. Arkill KP, Winlove CP. Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(6):708-14.
16. Duncan H, Jundt J, Riddle JM, Pitchford W, Christopherson T. The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am.* 1987;69(8):1212-20.
17. Holmdahl DE, Ingelmark BE. The Contact between the Articular Cartilage and the Medullary Cavities of the Bones. *Acta Anat.* 1951;12(4):341-9.
18. Allen MJ, Houlton JE, Adams SB, Rushton N. The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. *Vet Surg.* 1998;27(6):596-605.
19. Duda GN, Eckert-Hubner K, Sokiranski R, Kreutner A, Miller R, Claes L. Analysis of inter-fragmentary movement as a function of musculoskeletal loading conditions in sheep. *J Biomech.* 1998;31(3):201-10.
20. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(355 Suppl):S56-65.
21. S.B. PARGFA. Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management. Moskowitz R.W. ARD, Hochberg M.C., Buckwalter J.A., Goldberg V.M., editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
22. Roland W. Moskowitz RDA, Joseph A. Buckwalter, Victor M. Goldberg, Marc C. Hochberg, editor. Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
23. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1(6):461-8.
24. Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB. Articular-Cartilage - Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitating Repair. *Bris Myer Z.* 1990:19-56.
25. Linn FC, Sokoloff L. Movement and Composition of Interstitial Fluid of Cartilage. *Arthritis and Rheumatism.* 1965;8(4):481-494.
26. Oegema TR, Jr., Carpenter RJ, Hofmeister F, Thompson RC, Jr. The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microsc Res Tech.* 1997;37(4):324-32.
27. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2001;391:S26-S33.
28. Kirsch T, Vondermark K. Isolation of Human Type-X Collagen and Immunolocalization in Fetal Human Cartilage. *Eur J Biochem.* 1991;196(3):575-80.

29. Jung CK. Articular Cartilage: Histology and Physiology. In: Shetty AA, Kim S-J, Nakamura N, Brittberg M, editors. *Techniques in Cartilage Repair Surgery*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 17-21.
30. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol*. 2000;35(10):581-8.
31. Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:230-7.
32. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(8):1077-89.
33. Dayer JM. The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2004;18(1):31-45.
34. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum*. 2006;54(5):1357-60.
35. Sandy JD. A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(2):95-100.
36. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):224.
37. Liebich HJ. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. Liebich HJ, editor. Stuttgart: Schattauer Verlagsgesellschaft mbH; 2009.
38. Findlay DM, Kuliwaba JS. Bone-cartilage crosstalk: a conversation for understanding osteoarthritis. *Bone Res*. 2016;4:16028.
39. Clark JM, Huber JD. The structure of the human subchondral plate. *J Bone Joint Surg Br*. 1990;72(5):866-73.
40. Lyons TJ, McClure SF, Stoddart RW, McClure J. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskelet Disord*. 2006;7:52.
41. Pan J, Zhou X, Li W, Novotny JE, Doty SB, Wang L. In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *J Orthop Res*. 2009;27(10):1347-52.
42. Wang B, Zhou X, Price C, Li W, Pan J, Wang L. Quantifying load-induced solute transport and solute-matrix interaction within the osteocyte lacunar-canalicular system. *J Bone Miner Res*. 2013;28(5):1075-86.
43. O'Hara BP, Urban JP, Maroudas A. Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann Rheum Dis*. 1990;49(7):536-9.

44. Hwang J, Bae WC, Shieu W, Lewis CW, Bugbee WD, Sah RL. Increased hydraulic conductance of human articular cartilage and subchondral bone plate with progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(12):3831-42.
45. Botter SM, van Osch GJ, Clockaerts S, Waarsing JH, Weinans H, van Leeuwen JP. Osteoarthritis induction leads to early and temporal subchondral plate porosity in the tibial plateau of mice: an in vivo microfocal computed tomography study. *Arthritis Rheum.* 2011;63(9):2690-9.
46. Iijima H, Aoyama T, Tajino J, Ito A, Nagai M, Yamaguchi S, et al. Subchondral plate porosity colocalizes with the point of mechanical load during ambulation in a rat knee model of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(2):354-63.
47. Amin AK, Huntley JS, Simpson AH, Hall AC. Chondrocyte survival in articular cartilage: the influence of subchondral bone in a bovine model. *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91(5):691-9.
48. Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE. Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1 β and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(11):979-87.
49. Ludin A, Sela JJ, Schroeder A, Samuni Y, Nitzan DW, Amir G. Injection of vascular endothelial growth factor into knee joints induces osteoarthritis in mice. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2013;21(3):491-7.
50. Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, Im H-J. Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2016;31(5):911-24.
51. Lories RJ, Corr M, Lane NE. To Wnt or not to Wnt: the bone and joint health dilemma. *Nature Reviews Rheumatology.* 2013;9:328.
52. Oh H, Chun C-H, Chun J-S. Dkk-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis & Rheumatism.* 2012;64(8):2568-78.
53. Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson L, McCarthy HE, Anabalsi T, et al. Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS One.* 2010;5(10):e13246.
54. Hattori S, Oxford C, Reddi AH. Identification of superficial zone articular chondrocyte stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(1):99-103.
55. Jiang Y, Tuan RS. Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(4):206-12.

56. Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume*. 1976;58(2):230-3.
57. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. 1999;17(2):205-13.
58. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal Cell-Based Repair of Large, Full-Thickness Defects of Articular Cartilage. *JBJS*. 1994;76(4):579-92.
59. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002;10(3):199-206.
60. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;231(25):232-5.
61. Frean SP, Abraham LA, Lees P. In vitro stimulation of equine articular cartilage proteoglycan synthesis by hyaluronan and carprofen. *Res Vet Sci*. 1999;67(2):183-90.
62. Blot L, Marcelis A, Devogelaer JP, Manicourt DH. Effects of diclofenac, aceclofenac and meloxicam on the metabolism of proteoglycans and hyaluronan in osteoarthritic human cartilage. *Br J Pharmacol*. 2000;131(7):1413-21.
63. Bjorkman DJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. *Am J Med*. 1996;101(1A):25S-32S.
64. Garella S, Matarese RA. Renal effects of prostaglandins and clinical adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Medicine (Baltimore)*. 1984;63(3):165-81.
65. Sidler M, Fouche N, Meth I, von Hahn F, von Rechenberg B, Kronen PW. Preliminary study on carprofen concentration measurements after transcutaneous treatment with Vetdrop(R) in a microfracture joint defect model in sheep. *BMC Vet Res*. 2014;10:268.
66. Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L, et al. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res*. 2001;16(10):1846-53.
67. Kudo S, Mizuta H, Takagi K, Hiraki Y. Cartilaginous repair of full-thickness articular cartilage defects is induced by the intermittent activation of PTH/PTHrP signaling. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(7):886-94.
68. Lugo L, Villalvilla A, Gomez R, Bellido M, Sanchez-Pernaute O, Largo R, et al. Effects of PTH [1-34] on synovioathy in an experimental model of osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(12):1619-30.

69. Orth P, Cucchiaroni M, Zurakowski D, Menger MD, Kohn DM, Madry H. Parathyroid hormone [1-34] improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(4):614-24.
70. Nuss KM, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord*. 2006;7:67.
71. M K. Screeningversuch zur Optimierung synthetischer und fibriner Hydrogele als dreidimensionale Trägersubstanz für Bone Morphogenic Protein, Transforming Growth Factor β and Parathormon zur Beschleunigung der Knochenheilung [Dissertation]. Zürich: Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich; 2003.
72. Klein K. In vivo Studie verschiedener Hydrogele mit variabler Porenstruktur im Vergleich [Dissertation]. Zürich: Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich; 2008.
73. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*. 1961;43-B:752-7.
74. Mankin HJ, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *J Bone Joint Surg Am*. 1970;52(3):424-34.
75. Schubotz R. Der Einfluss eines definierten Defektes im subchondralen Knochen auf den darüber liegenden Knochen [Dissertation]. Zürich: Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich; 2008.
76. Geyer G, Linss W. Toluidine blue staining of cartilage proteoglycan subunits. *Acta Histochem*. 1978;61(1):127-34.
77. Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin Sports Med*. 2005;24(1):1-12.
78. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect*. 2005;54:465-80.
79. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(4):219-27.
80. Agerbaek MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde L, Melsen F. A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner*. 1991;12(2):101-12.
81. Waselau AC, Nadler D, Muller JM, Zlinszky K, Hilbe M, Auer JA, et al. The effect of cartilage and bone density of mushroom-shaped, photooxidized, osteochondral transplants: an experimental study on graft performance in sheep using transplants originating from different species. *BMC Musculoskelet Disord*. 2005;6:60.
82. Kumar N, Newman RJ. Complications of intra- and peri-articular steroid injections. *Br J Gen Pract*. 1999;49(443):465-6.

83. Charalambous CP, Tryfonidis M, Sadiq S, Hirst P, Paul A. Septic arthritis following intra-articular steroid injection of the knee - a survey of current practice regarding antiseptic technique used during intra-articular steroid injection of the knee. *Clin Rheumatol*. 2003;22(6):386-90.
84. Bollet AJ, Nance JL. Biochemical Findings in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage. II. Chondroitin Sulfate Concentration and Chain Length, Water, and Ash Content. *J Clin Invest*. 1966;45(7):1170-7.
85. Hjertquist SO, Lemperg R. Identification and concentration of the glycosaminoglycans of human articular cartilage in relation to age and osteoarthritis. *Calcif Tissue Res*. 1972;10(3):223-37.
86. Maroudas A, Evans H, Almeida L. Cartilage of the hip joint. Topographical variation of glycosaminoglycan content in normal and fibrillated tissue. *Ann Rheum Dis*. 1973;32(1):1-9.
87. Bullough PG. The role of joint architecture in the etiology of arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12 Suppl A:S2-9.
88. Goldring SR. Role of bone in osteoarthritis pathogenesis. *Med Clin North Am*. 2009;93(1):25-35, xv.
89. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong LT. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*. 2006;38(2):234-43.
90. Suzuki HK, Mathews A. Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N'-di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein. *Stain Technol*. 1966;41(1):57-60.
91. Custers RJH, Creemers LB, Verbout AJ, van Rijen MHP, Dhert WJA, Saris DBF. Reliability, reproducibility and variability of the traditional Histologic/Histochemical Grading System vs the new OARSI Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007;15(11):1241-8.
92. Ostergaard K, Andersen CB, Petersen J, Bendtzen K, Salter DM. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1999;58(4):208-13.
93. Hao T, Wen N, Cao JK, Wang HB, Lü SH, Liu T, et al. The support of matrix accumulation and the promotion of sheep articular cartilage defects repair in vivo by chitosan hydrogels. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010;18(2):257-65.
94. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, et al. Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *JBJS*. 2005;87(12):2671-86.

95. Hoemann CD, Sun J, Légaré A, McKee MD, Buschmann MD. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(4):318-29.
96. Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, et al. Chitosan–glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2007;15(1):78-89.
97. Neves SC, Moreira Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, Van Blitterswijk CA, Alves NM, et al. Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials*. 2011;32(4):1068-79.
98. Kemper M. Screeningversuch zur Optimierung synthetischer und fibriner Hydrogele als dreidimensionale Trägersubstanz für Bone Morphogenetic Protein, Transforming Growth Factor-beta und Parathormon zur Beschleunigung der Knochenheilung [Dissertation]: Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich; 2003.
99. Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI. Cartilage Regeneration Using Principles of Tissue Engineering. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2001;391:S161-S70.

7 Abkürzungsverzeichnis

C lat	-	lateral Condylus des Femurs
C med	-	medialer Condylus des Femurs
Ctr	-	Kontrollgruppe
DMK	-	Durchmesser Knorpel
DMKD	-	Durchmesser von Knorpeloberfläche bis proximaler Defektrand
DMKZ	-	Durchmesser kalzifizierte Zone
FKZ	-	Fläche kalzifizierte Zone des Knorpels
I	-	Integrität der Knorpel-Knochengrenze
KD	-	Distanz Tidemark bis proximaler Defektrand
M ges	-	Mankin Gesamt-Grad
MW	-	Mittelwert
OA	-	Osteoarthritis
PTH	-	Parathormon
STABW	-	Standardabweichun
Str	-	Struktur
TB	-	Toluidinblau-Färbung
TP lat	-	laterales Tibiaplateau
TP med	-	mediales Tibiaplateau
Z	-	Zellen

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1.1: Alter und Gewicht der Versuchstiere	17
Tab. 3.7.1: Makroskopische Knorpelbeurteilung nach Outerbridge	25
Tab. 3.7.2: Modifizierter Mankin-Score zur Knorpelbeurteilung	27
Tab. 4.3.1: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen für die Knorpelvaluierung nach Outerbridge.....	34
Tab. 4.6.1: Mittelwerte und Standardabweichungen aller erhobenen Parameter	40
Tab. 4.6.2: Median und Range für die Parameter der histologischen Auswertung nach Mankin	41
Tab. 4.6.3: Auswertung der kalzifizierten „Zell-Kappen“	43
Tab. 5.7.1: Mankin-Gesamt-Grade für jedes einzelne Tier	54
Tab. 10.1.1: p-Werte der berechneten Korrelationen	69

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.4.1: Darstellung der Schichten des Knorpels	7
Abb. 2.5.1: Gesunder hyaliner Gelenkknorpel	8
Abb. 2.5.2: Stark geschädigter hyaliner Gelenkknorpel	8
Abb. 2.7.1: Einzelteile des Handstücks	14
Abb. 2.7.2: Hinteres Handstück mit Ampulle	14
Abb. 2.7.3: Monitor und Handstück des transdermalen Applikationssystems Vetdrop®	14
Abb. 2.7.4: Sauerstoffgenerator	14
Abb. 3.4.1: Bild der verwendeten Schablone	21
Abb. 3.4.2: Auskürettieren des späteren Defekts.....	21
Abb. 3.4.3: Darstellung des Tibia-Slots.....	21
Abb. 3.4.4: Auffüllen des Defekts mit autogenem Knochenmaterial.....	21
Abb. 3.4.5: Hautverschluss mit Klammern.....	21
Abb. 3.5.1: Behandlung mit Vetrop®.....	23
Abb. 3.7.1: „Cutting cone“	29
Abb. 4.3.1: Grafische Darstellung der Mittelwerte für die Knorpelbeurteilung nach Outerbridge.	33
Abb. 4.4.1: Grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und zugehörigen Standardabweichungen der Flächen der kalzifizierten Zone	35
Abb. 4.4.2: Grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und zugehörigen Standardabweichungen der Durchmesser der kalzifizierten Zonen	36
Abb. 4.4.3: Grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und zugehörigen Standardabweichungen der Knorpeldurchmesser	37
Abb. 4.4.4: Grafische Darstellung der jeweiligen Medianwerte und zugehörigen Standardabweichungen der Distanzen von Knorpeloberfläche bis zum proximalen Defektrand	38
Abb. 4.6.1: „Kalzifizierte Zellkappen“ nahe der Tidemark.....	43
Abb. 4.6.2: „Kalzifizierte Zellkappen“ in unterschiedlichen Abständen von der Tidemark;.....	43
Abb. 5.7.1: Unterschied in der Höhe der Mankin-Gesamt-Grade bezogen auf Median und Mittelwert der einzelnen Behandlungsgruppen	55
Abb. 10.2.1 : Fluoreszenzschnitt im Tricolor-Channel	70

Abb.10.2.2: Aufnahmen der Fluoreszenzschnitte aller Behandlungsgruppen im Tricolor-Channel.	72
--	----

10 Anhang

10.1 Tabellen

Tab. 10.1.1: p-Werte der berechneten Korrelationen; statistisch signifikante Werte sind grau hinterlegt ($p < 0.05$); DMKZ: Durchmesser der kalzifizierten Zone, DMK: Durchmesser Knorpel, KD: Distanz von der Tidemark bis Defekt, FKZ: Fläche der kalzifizierten Zone, TPmed: mediales Tibiaplateau, TPlat: laterales Tibiaplateau, Cmed: medialer Condylus des Femur, Clat: lateraler Condylus des Femur, Mges: Mankin-Grade gesamt, Str.: Struktur (Mankin Parameter), Z: Zellen (Mankin Parameter), TB: Toluidinblau-Färbung (Mankin Parameter), I: Integrität der Knorpel-Knochengrenze (Mankin Parameter)

Korrelationen ($p < 0.05$)													
	DMKZ	DMK	KD	FKZ	TP med	TP lat	C med	C lat	M ges	Str.	Z	TB	I
DMKZ		0.080	0.752	0.000	0.408	0.705	0.876		0.723	0.952	0.910	0.864	0.052
DMK	0.080		0.039	0.092	0.762	0.644	0.667		0.039	0.068	0.014	0.111	0.212
KD	0.752	0.039		0.391	0.029	0.607	0.470		0.000	0.000	0.000	0.000	0.419
FKZ	0.000	0.092	0.391		0.263	0.768	0.504		0.353	0.484	0.579	0.661	0.040
TPmed	0.408	0.762	0.029	0.263		0.012	0.961		0.046	0.046	0.041	0.226	0.537
TPlat	0.705	0.644	0.607	0.768	0.012		0.152		0.491	0.634	0.784	0.507	0.198
Cmed	0.876	0.667	0.470	0.504	0.961	0.152			0.592	0.323	0.809	0.826	0.380
Clat													
Mges	0.723	0.039	0.000	0.353	0.046	0.491	0.592			0.000	0.000	0.000	0.594
Str.	0.952	0.068	0.000	0.484	0.046	0.634	0.323		0.000		0.000	0.008	0.393
Z	0.910	0.014	0.000	0.579	0.041	0.784	0.809		0.000	0.000		0.000	0.667
TB	0.864	0.111	0.000	0.661	0.226	0.507	0.826		0.000	0.008	0.000		0.554
I	0.052	0.212	0.419	0.040	0.537	0.198	0.380		0.549	0.939	0.667	0.554	

10.2 Abbildungen

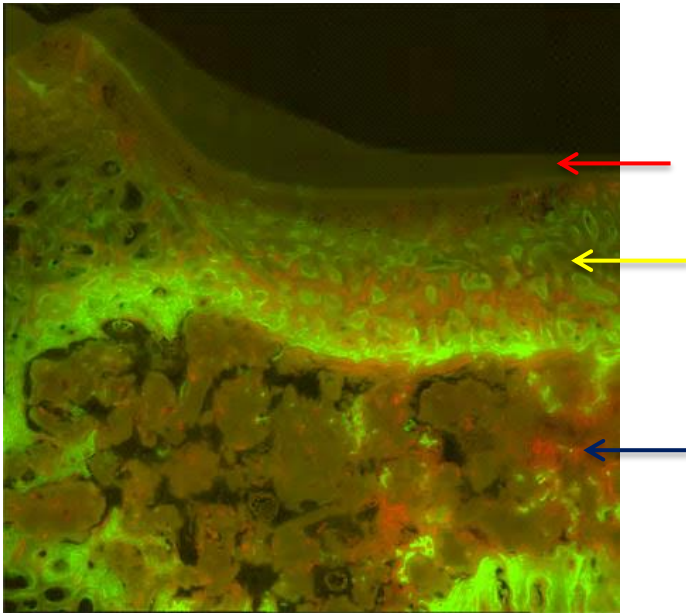
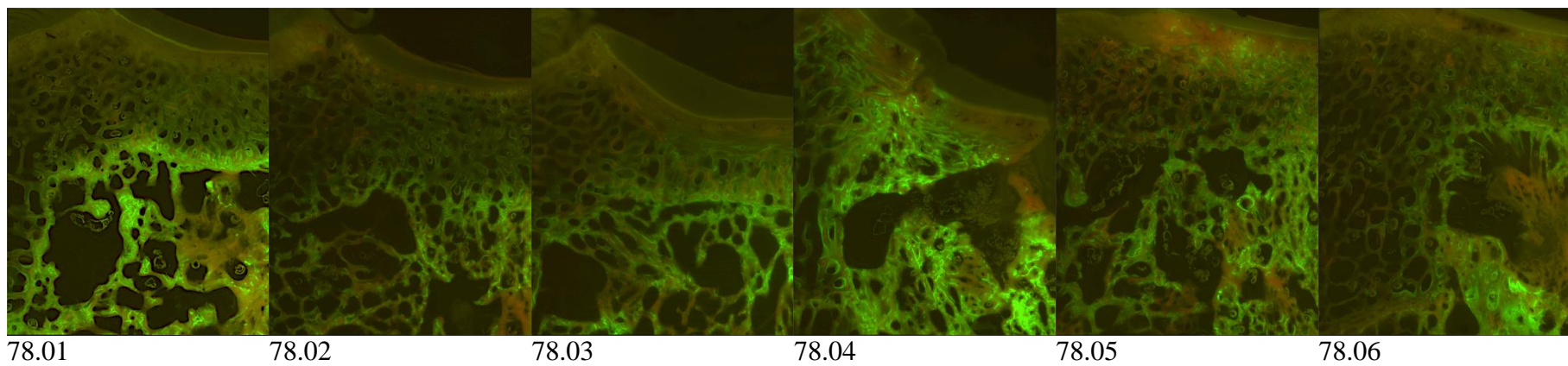
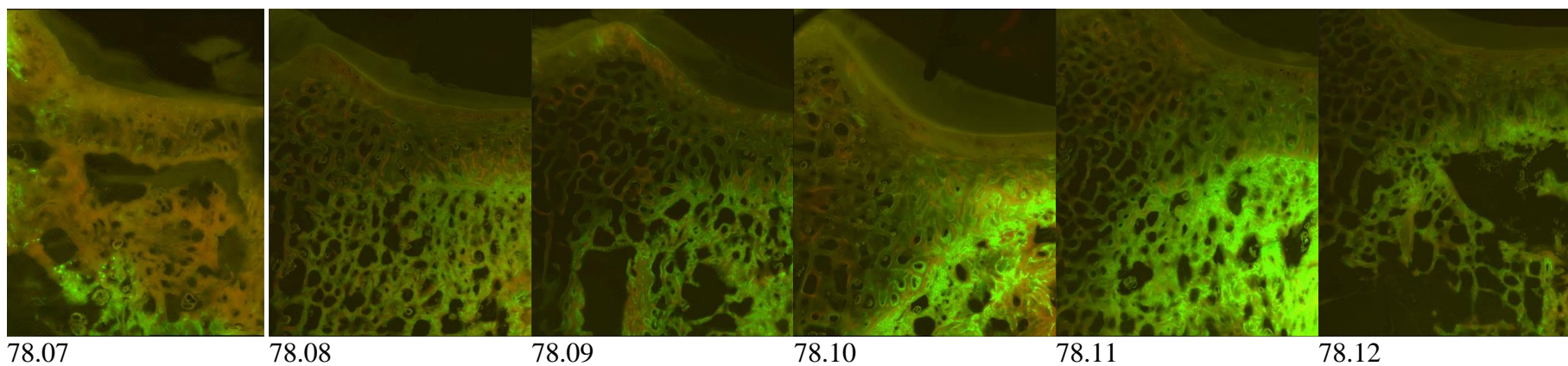


Abb. 10.2.1 : Fluoreszenzschnitt im Tricolor-Channel zeigt den Bereich des medialen Tibiaplateaus von Tier Nr. 78.15; roter Pfeil: Knorpel, gelber Pfeil: Bereich des subchondralen Knochens, blauer Pfeil: Bereich des gesetzten Defektes; Erläuterung soll auch für Abb. 10.2.2 gelten.

Diclofenac



Kontrolle



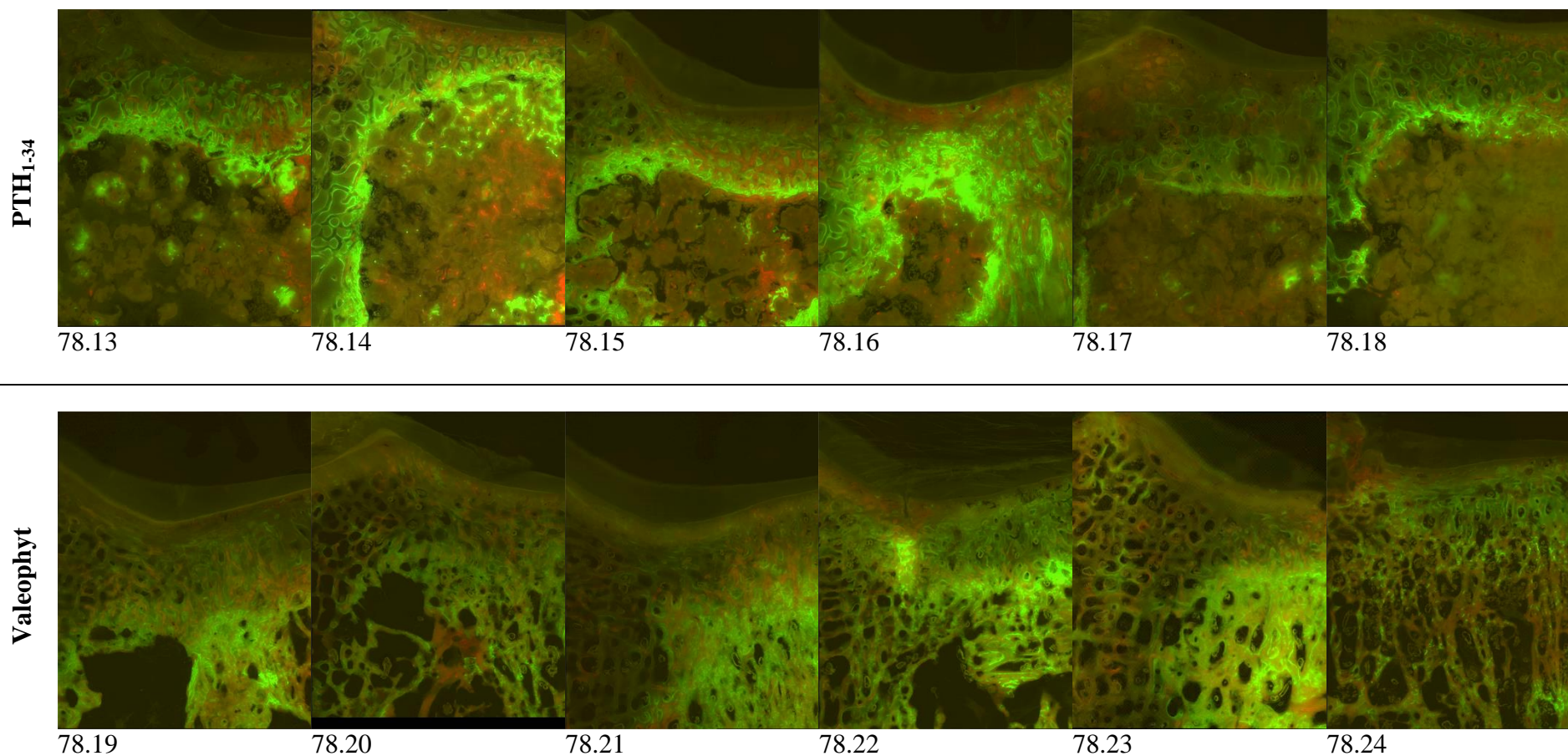


Abb.10.2.2: Aufnahmen der Fluoreszenzschnitte aller Behandlungsgruppen im Tricolor-Channel. Die zugehörigen Tiernummern sind für jedes Bild jeweils darunter angeführt. Bereich des medialen Tibiaplateaus (siehe auch Abb. 10.2.1). Tricolor = Kombination aus Calcein grün, Xylenol orange und Tetrazyklin. Calcein grün vier Wochen postoperativ, Xylenol orange vier Wochen vor der Schlachtung und Oxytetrazyklin drei Tage vor der Schlachtung injiziert. Calcein grün fluoresziert hier am stärksten. Vergleicht man die verschiedenen Behandlungsgruppen miteinander, so ist ersichtlich, dass Remodeling-Vorgänge vor allem in den ersten vier Wochen postoperativ abspielten, dies war am ausgeprägtesten in der PTH-Gruppe. Diclofenac- und Valeophyt-Gruppe fluoreszierten weniger stark als die PTH-Gruppe aber deutlich stärker als die Kontrollgruppe.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Arbeitgeberin Dr. Andrea Lackner-Oberle, die mir diese Dissertation in vielerlei Hinsicht erst ermöglicht hat.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter für ihre Unterstützung, bei meiner Schwester Nadja für ihren technischen Support und bei meinem Freund Balthasar für die mentale Stütze. Danke.

Curriculum Vitae

Name	Joya Marina Kaserer
Geburtsdatum	02.04.1990
Geburtsort	Bludenz
Nationalität	Österreich
September 1996– Juli 2000	Volksschule, Bürs, Österreich
17. Juni 2008	Matura, Bundesgymnasium, Bludenz, Österreich
Oktober 2009 – Mai 2016	Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität, Wien, Österreich
10. Mai 2016	Abschlussprüfung Veterinärmedizinische Universität, Wien, Österreich
November 2016 – Januar 2019	Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS am Institut für Molekulare Mechanismen bei Krankheiten der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich Direktor Prof. Dr. med. vet et phil. II Michael O. Hottinger
Seit Juli 2016	Assistentztierärztin, Tierarztpraxis Dr. Lackner-Oberle, Nüziders, Österreich
